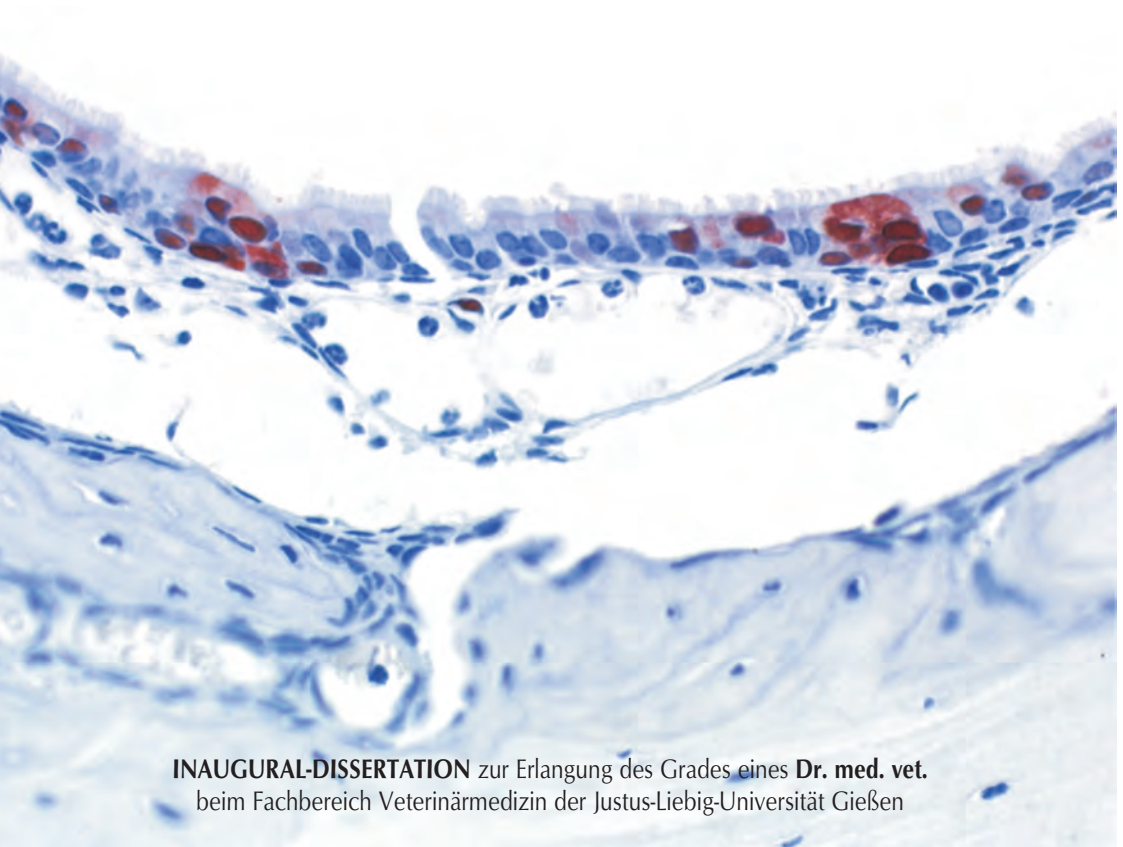


Christina Maresch

Studien zur Neuroinvasion und zum axonalen Transport
von Mutanten des Pseudorabiesvirus im Tiermodell
und an Neuronenkulturen



INAUGURAL-DISSERTATION zur Erlangung des Grades eines **Dr. med. vet.**
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2011

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2011

© 2011 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Veterinär-Pathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen
und
dem Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit,
Institut für Infektionsmedizin, Greifswald – Insel Riems
Betreuer: Prof. Dr. Jens Peter Teifke

**Studien zur Neuroinvasion und zum axonalen Transport
von Mutanten des Pseudorabiesvirus im Tiermodell
und an Neuronenkulturen**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von
Christina Maresch
Tierärztin aus Wismar

Gießen 2010

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Martin Kramer

Gutachter: Prof. Dr. Jens Peter Teifke
Prof. Dr. Tillman Rümenapf

Tag der Disputation: 20.12.2010

Meiner Familie

„Glaube denen, die die Wahrheit suchen,
und zweifele an denen, die sie gefunden
haben“

André Gide

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Christina Maresch

Teile dieser Arbeit wurden publiziert:

Fuchs W, Granzow H, Klupp BG, Karger A, Michael K, Maresch C, Klopffleisch R, Mettenleiter TC

Relevance of the interaction between alphaherpesvirus UL3.5 and UL48 proteins for virion maturation and neuroinvasion. J Virol. 2007 Sep;81:9307-18

Böttcher S, Granzow H, Maresch C, Möhl B, Klupp BG, Mettenleiter TC.

Identification of functional domains within the essential large tegument protein pUL36 of pseudorabies virus. J Virol. 2007 Dec;81:13403-11

Böttcher S, Maresch C, Granzow H, Klupp BG, Teifke JP, Mettenleiter TC.

Mutagenesis of the active-site cysteine in the ubiquitin-specific protease contained in large tegument protein pUL36 of pseudorabies virus impairs viral replication in vitro and neuroinvasion in vivo. J Virol. 2008 Jun;82:6009-16

Krautwald M, Maresch C, Klupp BG, Fuchs W, Mettenleiter TC.

Deletion or green fluorescent protein tagging of the pUL35 capsid component of pseudorabies virus impairs virus replication in cell culture and neuroinvasion in mice. *J Gen Virol.* 2008 Jun;89:1346-51

Maresch C, Granzow H, Negatsch A, Klupp BG, Fuchs W, Teifke JP, Mettenleiter TC.

Ultrastructural analysis of virion formation and anterograde intraaxonal transport of the alphaherpesvirus pseudorabies virus in primary neurons. *J Virol.* 2010 Jun;84(11):5528-39

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
1 Einleitung.....	1
2 Literaturübersicht	2
2.1 Herpesviren als Krankheitserreger bei Tieren	2
2.2 Das Pseudorabiesvirus (PrV).....	3
2.2.1 Morphologie.....	3
2.2.2 Replikationszyklus	5
2.2.3 PrV-Infektionen <i>in vivo</i>	9
2.3 Neuroanatomische Grundlagen der Neuroinvasion und Neurovirulenz	11
3 Material und Methoden.....	18
3.1 Material	18
3.1.1 Virusstämme	18
3.1.2 Zelllinien	19
3.1.3 Versuchstiere.....	20
3.1.4 Enzyme	20
3.1.5 Seren und Antiseren	20
3.1.6 Chemikalien, Kits und Arzneimittel	21
3.1.7 Geräte und Instrumente.....	23
3.1.8 Verbrauchsmaterial	23
3.1.9 Stammlösungen und Puffer	24
3.2 Methoden.....	32
3.2.1 In-vitro-Untersuchungen.....	32
3.2.1.1 Kultivierung von nichtneuronalen Zellen	32
3.2.1.2 Transfektion.....	32
3.2.1.3 Virusanzucht.....	33
3.2.1.4 Plaquetest	33
3.2.1.5 Kinetik	33
3.2.1.6 DNA-Isolierung.....	34
3.2.1.7 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration.....	34
3.2.1.8 DNA-Spaltung mit Restriktionsenzymen	34
3.2.1.9 DNA-Agarosegelelektrophorese	34
3.2.1.10 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	35
3.2.1.11 Real-Time PCR zum Nachweis von PrV.....	35
3.2.1.12 Southern-Blot-Hybridisierung	36
3.2.1.13 Western Blot.....	37
3.2.2 Untersuchungen an primären Neuronenkulturen aus Rattenembryonen	38
3.2.2.1 Präparation des oberen Zervikalganglions aus Rattenembryonen	38
3.2.2.2 Vorbehandlung der Zellkulturgefäße.....	38
3.2.2.3 Anzucht im Drei-Kammer-Modell	39
3.2.2.4 Konfokale Zeitrafferaufnahmen	40
3.2.2.5 Messung des intraaxonalen Transportes	40
3.2.2.6 Immunfluoreszenztechniken.....	40
3.2.2.7 Elektronenmikroskopische Untersuchungen	41
3.2.2.8 In-vivo-Untersuchungen.....	41
3.2.2.9 Versuchstiere	41
3.2.2.10 Intranasale Inokulation	42
3.2.2.11 Intradermale Inokulation („Flankenmodell“)	42

3.2.2.12	Organentnahme und Fixierung	42
3.2.3	Histopathologische Untersuchungen	43
3.2.3.1	Einbettung und Herstellung von Paraffinschnitten	43
3.2.3.2	Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE)	43
3.2.3.3	ABC-Methode	44
3.2.3.4	Nicht-radioaktive In-situ-Hybridisierung	45
4	Ergebnisse	47
4.1	In-vivo-Untersuchungen	47
4.1.1	Verlauf der AK in Schweinen nach experimenteller Infektion	47
4.1.2	Bestimmung der mittleren Überlebenszeit in Mäusen nach PrV-Infektion	50
4.1.3	Intradermale Inokulation von PrV-Kaplan	52
4.1.4	Intranasale Inokulation von PrV-Kaplan	54
4.1.5	In-vivo-Charakterisierung von PrV-ΔUL3.5-Mutanten	55
4.1.5.1	Intranasale Inokulation in Mäusen von PrV-ΔUL3.5F	55
4.1.5.2	Intranasale Inokulation in Mäusen von PrV-ΔUL3.5/48	56
4.1.6	In-vivo-Charakterisierung von UL35-Mutanten	57
4.1.6.1	Intranasale Inokulation von PrV-ΔUL35	57
4.1.6.2	Intranasale Inokulation von PrV-UL35GFP	58
4.1.6.3	Intranasale Inokulation von PrV-ΔUL35Resc	58
4.1.7	In-vivo-Charakterisierung von UL36-Mutanten	59
4.1.7.1	Intranasale Inokulation von PrV-ΔUL36F	59
4.1.7.2	Intranasale Inokulation von PrV-UL36Δ2087-2795	59
4.1.7.3	Intranasale Inokulation von PrV-UL36Δ22-248	59
4.1.7.4	Intranasale Inokulation von PrV-UL36Δ748-991 und PrV-UL36Δ2087-2981	60
4.1.7.5	Intranasale Inokulation von PrV-UL36Δ22-248Δ2087-2981	60
4.1.7.6	Intranasale Inokulation von PrV-UL36(C ₂₆ S)	60
4.1.7.7	Intranasale Inokulation von PrV-UL36(C ₂₆ S)R	62
4.1.7.8	In-vivo-Charakterisierung von PrV-ΔUL21/US3	63
4.2	In-vitro-Untersuchungen	66
4.2.1	Herstellung und In-vitro-Charakterisierung von PrV-ΔUL21/US3/UL35mCherry	66
4.2.2	Untersuchung des intraaxonalen Transportes mit konfokaler Laser-Scan-Mikroskopie	68
4.2.2.1	Untersuchungen zum retrograden intraaxonalen Transport	70
4.2.2.1.1	PrV-Kaplan	71
4.2.2.1.2	PrV-Bartha	72
4.2.2.1.3	PrV-ΔUS9	73
4.2.2.1.4	PrV-ΔUL11	73
4.2.2.1.5	PrV-ΔUL11/US9	73
4.2.2.1.6	PrV-ΔgE	74
4.2.2.1.7	PrV-ΔUL48	74
4.2.2.1.8	PrV-ΔUL21/US3	74
4.2.2.1.9	PrV-ΔUL37	74
4.2.2.1.10	PrV-UL36(C ₂₆ S)	74
4.2.2.2	Untersuchungen zum anterograden Transport	75
4.2.2.2.1	PrV-Kaplan	76
4.2.2.2.2	PrV-Bartha	77
4.2.2.2.3	PrV-ΔUS9	78
4.2.2.2.4	PrV-ΔUL11	78
4.2.2.2.5	PrV-ΔUL11/US9	78
4.2.2.2.6	PrV-ΔgE	79
4.2.2.2.7	PrV-ΔUL48	79
4.2.2.2.8	PrV-ΔUL21/US3	79
4.2.2.2.9	PrV-ΔUL37	79
4.2.2.2.10	PrV-UL36(C ₂₆ S)	80
4.2.3	Untersuchung des neuronalen Transportes mittels Elektronenmikroskopie	80
4.2.3.1	Transport nach Infektion primärer muriner Neuronenkulturen mit PrV-Kaplan	81
4.2.3.2	Transport nach Infektion primärer muriner Neuronenkulturen mit PrV-gB ⁻	82

5	Diskussion	84
6	Zusammenfassung	100
7	Literaturverzeichnis	104
8	Anhang.....	122
8.1	Abkürzungen.....	122

1 Einleitung

Das Pseudorabiesvirus (PrV) ist der Erreger der Aujeszky'schen Krankheit (AK) und besitzt unter den Herpesviren das größte Wirtsspektrum. Im natürlichen Wirt, dem Schwein verläuft die Erkrankung altersabhängig verschieden. So sind zentralnervöse Symptome zumeist nur bei Saugferkeln zu finden, wohingegen eine Infektion des Respirationstrakts bei älteren Tieren dominiert (Gerds et al. 1997). Die Erkrankung verläuft bei allen anderen empfänglichen Spezies immer tödlich. Nach primärer Infektion des Schleimhautepithels findet *in vivo* eine Virusausbreitung über sensorische und motorische Nervenbahnen statt. Aufgrund dieser neurotrophen Eigenschaften kommt PrV auch eine Bedeutung bei der Erforschung intraaxonaler Transportprozesse und neuronaler Kreisläufe zu (Enquist et al. 1998; Mettenleiter 2008). Viruspartikel werden entlang von Mikrotubuli in retrograder Richtung von der Nervenendigung zum Zellkern sowie in umgekehrter anterograder Richtung über Motorproteine transportiert (Lycke et al. 1984; Sodeik 2000; Granzow et al. 2001; Döhner et al. 2006). Dennoch sind die molekularen Vorgänge des intraaxonalen Transports von Herpesviren bislang weitgehend ungeklärt und werden kontrovers diskutiert. Ultrastrukturelle Untersuchungen von Neuronen nach Infektion mit Herpesviren sind vergleichsweise selten (Diefenbach et al. 2008). Die Infektion des Nervensystems ist häufig mit einer schwerwiegenden klinischen Symptomatik verbunden. Untersuchungen in einem standardisierten Mausmodell konnten nach intranasaler Infektion die Bedeutung einzelner Tegument- und Membranproteine bei der Infektion *in vivo* nachweisen (Klopffleisch et al. 2004; 2006).

Ziel dieser Arbeit ist es, die Rolle weiterer herpesviraler Proteine *in vivo* nach Infektion von Mäusen und Schweinen hinsichtlich ihrer Bedeutung bei der Neuroinvasion und Neurovirulenz zu untersuchen. Die Vorgänge des intraaxonalen Transports nach Infektion von primären Neuronen aus Rattenembryonen sollen mit Hilfe der konfokalen Laser-Scan-Mikroskopie von mit fluoreszierenden Proteinen markierten Viruspartikeln quantifiziert und zusammen mit der Elektronenmikroskopie analysiert werden.

2 Literaturübersicht

2.1 Herpesviren als Krankheitserreger bei Tieren

Herpesviren kommt aufgrund ihrer weiten Verbreitung und ihrer großen Anzahl eine erhebliche human- und veterinärmedizinische Bedeutung zu. Mittlerweile konnten über 200 verschiedene Herpesviren identifiziert werden. Aufgrund von Analysen werden die drei Familien *Herpes*-, *Alloherpes*- und *Malacoherpesviridae* in der neu gebildeten Ordnung der *Herpesvirales* zusammengefasst. Die Familie der *Herpesviridae* enthält Herpesviren der Säuger, Vögel und Reptilien in den Unterfamilien der *Alpha*-, *Beta*- und *Gammaherpesvirinae*. Herpesviren von Fischen und Amphibien gehören in die Familie der *Alloherpesviridae*. In der Familie der *Malacoherpesviridae* findet sich ein Herpesvirus der Muscheln (McGeoch et al. 2006; Davison et al. 2009).

Alphaherpesviren zeichnen sich durch ein breites Wirtsspektrum, einen schnellen Replikationszyklus und die Fähigkeit zur Ausbildung einer Latenz in sensorischen Ganglien aus. Aufgrund molekularer Eigenschaften und Sequenzanalysen werden die vier Genera *Simplexvirus*, *Varicellovirus*, *Mardivirus* und *Iltovirus* unterschieden (Pellett und Roizman 2007).

Zu dem Genus *Simplexvirus* gehören neben den humanpathogenen Herpes simplex Viren Typ 1 und 2 (HSV-1 und -2) auch das Herpes B Virus. Dem Genus *Varicellovirus* werden das humanpathogene Varicella-Zoster Virus (VZV) und eine Reihe von tierpathogenen Herpesviren, unter anderem das bovine Herpesvirus 1 (BHV-1), die equinen Herpesviren 1 und 4 (EHV-1, 4) und das Pseudorabiesvirus (PrV, porcines, engl. suid Herpesvirus 1) des Schweins zugeordnet. Die Genera *Mardivirus* und *Iltovirus* enthalten den Erreger der Marekschen Krankheit (Mareks Disease Virus, MDV) bzw. das Virus der Infektiösen Laryngotracheitis (ILTV). Ebenfalls in die Gruppe der Alphaherpesviren zählen die bisher bekannten Herpesviren der Reptilien (McGeoch und Gatherer 2005; Davison et al. 2009).

Die Familie der Betaherpesviren zeichnet sich durch ein eingeschränktes Wirtsspektrum und einen langen Replikationszyklus aus. Latente Infektionen können in sekretorischen Drüsen, lymphoretikulären Zellen und in Epithelzellen der Niere beobachtet werden. Das humane Zytomegalievirus (HCMV) wird dem Genus *Cytomegalovirus*, das murine Zytomegalievirus (MCMV) dem Genus *Muromegalovirus* zugeordnet. Im Genus *Roseolovirus* finden sich die humanen Herpesviren 6 und 7 (HHV-6 und -7) und das

Genus *Proboscivirus* enthält das endotheliotrope Elefantenherpesvirus (EIHV-1; Garner et al. 2009).

Gammaherpesviren besitzen ein sehr enges Wirtsspektrum und vermehren sich vorrangig in B- und T-Lymphozyten. Zur Ausbildung einer Latenz kann es in lymphatischen Geweben kommen. Zu den Gammaherpesviren gehören die Genera *Lymphocryptovirus* mit dem humanen Herpesvirus 4 (Epstein-Barr-Virus, EBV) und *Rhadinovirus* mit dem humanen Herpesvirus 8 (Kaposi's sarcoma-associated Herpesvirus, KSHV). Ebenso zählen sieben bei Fledermäusen entdeckte Herpesviren in diese Unterfamilie (Wibbelt et al. 2007). Im Genus *Macavirus* finden sich die alcelaphinen Herpesviren 1 und 2 (AlHV-1, -2), das ovine Herpesvirus 2 (OvHV-2) sowie die suiden Herpesviren 3, 4 und 5 (SuHV-3, -4, -5). Dem Genus *Percavirus* werden die equinen Herpesviren 2 und 5 (EHV-2, -5) zugeordnet (Davison et al. 2009).

In der Familie der *Alloherpesviridae* finden sich neben Herpesviren von Fischen wie dem Channel Catfish Virus (IcHV-1), dem Aal-Herpesvirus (AngHV-1) und dem Koi-Herpesvirus (CyHV-3) auch Herpesviren der Amphibien (RaHV-1 und -2; Ilouze et al. 2006; Davison 1992).

Die Familie *Malacoherpesviridae* wird durch das bislang einzige bekannte Herpesvirus bei Invertebraten, das Austernherpesvirus 1 (OsHV-1), begründet (Davison et al. 2005).

Die pantropen Alphaherpesviren infizieren *in vitro* und *in vivo* unterschiedliche Zelltypen. Sie besitzen zudem die Fähigkeit, sich im Organismus über das periphere und zentrale Nervensystem auszubreiten. Dieser ausgeprägte Neurotropismus ist von großem wissenschaftlichen Interesse und insbesondere dem PrV kommt dabei eine Rolle als transneuronaler Marker und Vektor zu (Kristensson et al. 1982; Martin und Dolivo 1983; Rouiller et al. 1989; Strack et al. 1989; Strack und Loewy 1990; Enquist et al. 1998; Rothermel et al. 2007; Mettenleiter 2008).

2.2 Das Pseudorabiesvirus (PrV)

2.2.1 Morphologie

Der Aufbau der Virionen mit Nukleoid („core“), Kapsid, Tegument und Hülle ist allen Herpesviren gemeinsam (Abb. 1). Das Nukleoid enthält die doppelsträngige DNA und wird von einem ikosaedrischen Kapsid umgeben. Zwischen dem Kapsid und der glykoproteinhaltigen Hülle befindet sich eine proteinreiche Schicht, das Tegument.

Insgesamt besitzt das reife Virion eine Größe von ca. 150 nm (Honess und Watson 1977; Roizman 1996).

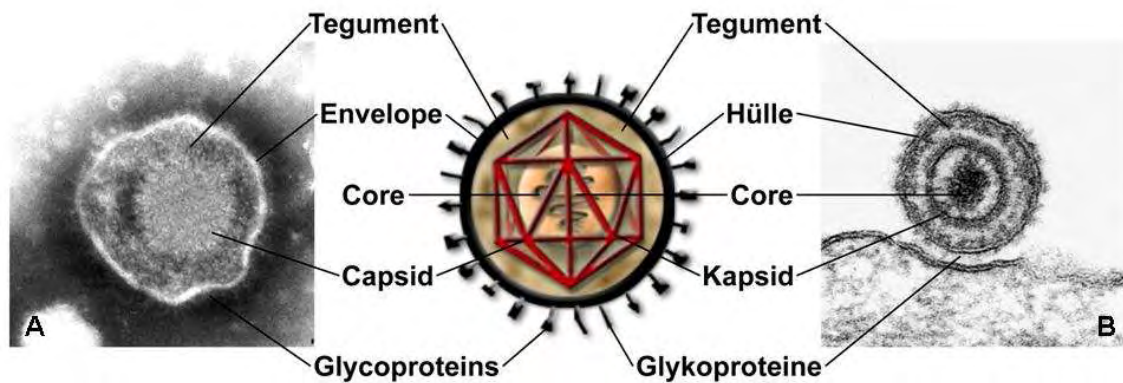


Abb. 1: **Ultrastruktureller und schematischer Aufbau des Pseudorabiesvirus.**

A: Negativkontrast; **B:** Ultradünnschnitt.

Elektronenmikroskopie: Dr. H. Granzow, Grafik: M. Jörn.

Das **Genom** des Pseudorabiesvirus besteht aus einer doppelsträngigen linearen DNA, die ca. 143 kbp umfasst und für 70 verschiedene Proteine kodiert (Klupp et al. 2004). Charakteristisch ist die Unterteilung des Genoms in eine lange (U_L) und eine kurze Region (U_S), die durch eine interne Wiederholungssequenz (IR) getrennt sind, die sich als terminale repetitive Sequenz (TR) wiederholt (Pellet und Roizman 2007).

Das ikosaedrische **Kapsid** weist eine Größe von ca. 100 nm auf und ist aus 162 Kapsomeren aufgebaut. 955 Moleküle des Hauptkapsidproteins pUL19 (VP5) bilden im reifen Viruspartikel die 150 Hexone und 12 Pentone (Homa und Brown 1997). Zur Stabilisierung sind die Kapsomeren durch die Triplexproteine pUL18 und pUL38 verbunden. Den Hexonen aufgelagert ist das nicht essentielle Protein pUL35 (VP26). Die Analyse einzelner Kapside kann mit Hilfe von bildgebenden Verfahren beispielsweise nach Fusion des pUL35 mit fluoreszierenden Proteinen, wie GFP erfolgen (Desai und Person 1998; Smith et al. 2001). Die Proteine pUL17 und pUL25 sind ebenfalls mit dem Kapsid assoziiert (Klupp et al. 2005b und 2006).

Das **Tegument**, eine amorphe Schicht aus mindestens 15 verschiedenen Proteinen, verbindet Kapsid und Virushülle (Mettenleiter 2006). Das Tegument enthält neben viralen auch einige zelluläre Proteine. So konnten durch Proteomanalysen bei verschiedenen Herpesviren Komponenten des Zytoskeletts (Aktin, Tubulin, Cofilin, Myosin), Proteine des Vesikeltransports (Clathrin) und die für Faltung und Stabilisierung verantwortlichen Hitzeschockproteine (Hsp 70, Hsp 90) in Virionen

identifiziert werden (Johannsen et al. 2004; Kattenhorn et al. 2004; Varnum et al. 2004; del Rio et al. 2005; Michael et al. 2006). Tegumentproteine sind nicht nur an der Virusreplikation beteiligt, sondern beeinflussen auch den zellulären Stoffwechsel (Batterson und Roizman 1983; Campbell et al. 1984; Berthomme et al. 1993; Fuchs et al. 2002a). Tegumentproteine spielen auch eine wichtige Rolle bei der Neuroinvasion. So führten Deletionen der Gene für pUL11 und pUL48 zu einer verlängerten Überlebenszeit und zu einer verzögerten Ausbreitung in Neuronen zweiter Ordnung in infizierten Mäusen. Eine essentielle Bedeutung bei der Neuroinvasion besitzt pUL37. So konnten zwar nach intranasaler Injektion infizierte respiratorische Epithelzellen in der Nase nachgewiesen werden, es kam aber zu keiner weiteren Ausbreitung in übergeordnete neuronale Zentren (Klopffleisch et al. 2004).

Die **Hülle** des Virions stellt eine Lipidmembran dar, in die zahlreiche virale Membranproteine eingelagert sind. Diese Proteine sind an der Virusadsorption, der Penetration, der Virusmorphogenese, der Freisetzung von Virionen und der Ausbreitung von Zelle zu Zelle beteiligt. Zudem beeinflussen sie den Tropismus und die Virulenz des Virus und sind Ziele der zellulären und humoralen Immunantwort (Ben Porat et al. 1986; Mettenleiter 2000). Das Genom des PrV kodiert für 15 Membranproteine, von denen ein Teil essentiell für die Virusreplikation *in vitro*, aber auch für die Neurovirulenz und die transneuronale Ausbreitung *in vivo* ist (Mettenleiter 2003; Pomeranz et al. 2005; Klopffleisch et al. 2006). Die elf identifizierten Glykoproteine des PrV weisen Homologien zu den entsprechenden HSV-1-Proteinen auf und werden als gB, gC, gD, gE, gG, gH, gI, gK, gL, gM und gN bezeichnet. Das Glykoprotein gB liegt als Homodimer vor, während gE/gI, gH/gL und gM/gN heterodimere Komplexe bilden (Mettenleiter 2000). Das Glykoprotein gG ist nicht Bestandteil der Virushülle, sondern wird von der infizierten Zelle sezerniert (Rea et al. 1985). Die Transmembranproteine pUL20, pUL43 und pUS9 liegen nicht glykosyliert vor (Pomeranz et al. 2005). In reifen Virionen fehlt das Transmembranprotein pUL34, das nur in primären Partikeln im Kernspalt identifiziert werden konnte (Fuchs et al. 2002b).

2.2.2 Replikationszyklus

Die Replikation verläuft in polarisierten und nicht polarisierten Zellen ähnlich und kann in (I) Adsorption und Penetration, (II) Transport zum Zellkern, (III) Replikation und Zusammenbau sowie (IV) Transport zum Austrittsort unterschieden werden (Abb. 2). Die Infektion beginnt mit der Anheftung der Virionen an die Zielzelle. Dieser Prozess

wird durch eine Interaktion von viralen Hüllproteinen mit Heparansulfatproteoglykanen der Zielzelle vermittelt (WuDunn und Spear 1989). Beim PrV konnte gC als Interaktionspartner identifiziert werden, bei HSV-1 bindet auch gB an Heparansulfate (Mettenleiter et al. 1990; Herold et al. 1994). Jedoch werden weder gC noch Heparansulfate für eine produktive Infektion benötigt, so dass bei der ersten Anheftung noch andere Faktoren eine Rolle spielen müssen (Mettenleiter et al. 1988; Karger et al. 1995). Von essentieller Bedeutung ist jedoch die anschließende Interaktion von gD mit sekundären Rezeptoren. Bei der direkten Zell-zu-Zell-Ausbreitung des PrV spielt gD hingegen keine Rolle, wohl aber bei HSV-1 (Rauh und Mettenleiter 1991; Peeters et al. 1992; Babic et al. 1993; Karger und Mettenleiter 1993). Die Fusion der Virushülle mit der Plasmamembran ist ein temperatur- und energieabhängiger Prozess und wird durch die Membranproteine gB, gH und gL vermittelt. Die Glykoproteine gB und gH/gL sind auch an der Ausbreitung von einer infizierten auf eine nicht infizierte Zelle beteiligt (Babic et al 1996; Mettenleiter 2003; Spear 2004).

Nach der Fusion verbleiben die Hüllproteine an der Plasmamembran, während einige Tegumentproteine, wie pUL41 und pUL48, ins Zytoplasma entlassen werden (Granzow et al. 2005; Luxton et al. 2005). pUL48 fungiert als Transaktivator der sehr frühen (immediate-early) Genexpression, während pUL41 am virusinduzierten „host cell shut-off“ beteiligt ist (Kwong und Frenkel 1989).

Die Kapside werden entlang der Mikrotubuli zu den Kernporen transportiert (Granzow et al. 1997; Sodeik et al. 1997). Die Freisetzung der viralen DNA erfolgt nach Bindung der Kapside an den Kernporenkomplex. Eine bedeutende Rolle bei diesem Prozess spielen wahrscheinlich die Proteine pUL25 und pUL36 (Granzow et al. 1997; Jovasevic et al. 2008; Preston et al. 2008).

Die Transkriptionskaskade läuft im Zellkern nach Eintritt der viralen DNA ab. Die Produkte der sehr frühen (immediate-early) Gene fungieren dabei als Aktivatoren, modulieren die antiviralen Aktivitäten der Zielzelle oder beeinflussen die Zellphysiologie so, dass sie für eine produktive Infektion geeignet ist. Frühe (early) Gene kodieren hauptsächlich für Genprodukte, die für die DNA-Replikation und den Nukleotidmetabolismus wichtig sind, während die späten (late) Gene vorwiegend für Proteine kodieren, die beim Zusammenbau und Austritt der Virionen von Bedeutung sind (Cheung 1989; Pomeranz et al. 2005). Nach der Replikation erfolgt die Verpackung des viralen Genoms im Kern in vorgefertigte Kapside.

Der Austritt aus dem Kern („nuclear egress“) beginnt mit dem Knospen („budding“) der Kapside an der inneren Kernmembran, wodurch sie ihre primäre Hülle erhalten. Ein Komplex aus den Proteinen pUL31 und pUL34 spielt dabei eine wichtige Rolle. In ihrer Abwesenheit werden keine Nukleokapside in das Zytoplasma entlassen (Klupp et al. 2000; Fuchs et al. 2002b). pUS3 ist eine bei den Alphaherpesviren konservierte Proteinkinase, die sowohl in primären als auch in reifen Virionen nachweisbar ist. Bei Deletion des Proteins wird der Fusionsprozess an der äußeren Kernmembran beeinträchtigt (Granzow et al. 2004; Mettenleiter und Minson 2006). Das unter den *Herpesviridae* konservierte Protein pUL25 ist essentiell für die Virusreplikation. Beim PrV ist das Protein nicht, wie für HSV-1 postuliert, an der Verpackung der DNA, sondern an der primären Umhüllung beteiligt. Jedoch konnte bislang keine direkte Interaktion von pUL25 mit pUL31/pUL34 nachgewiesen werden (Klupp et al. 2006). Glykoproteine, die eine Rolle bei der Adsorption und Penetration spielen, werden für den „nuclear egress“ nicht benötigt. Dies lässt den Schluss zu, dass unterschiedliche Mechanismen bei den Penetrationsprozessen während der Virusmorphogenese beteiligt sind (Klupp et al. 2008).

Durch Protein-Protein-Interaktionen erhalten die Kapside nach Freisetzung ins Zytoplasma ihr Tegument sowie ihre sekundäre Hülle (Mettenleiter 2006). Immunelektronenmikroskopische Studien belegen, dass bereits kurz nach Freisetzung aus dem Kernspalt die Proteine pUS3, pUL36 und pUL37 am Kapsid angelagert werden (Klupp et al. 2002). pUL36 bildet die innerste Schicht des Teguments und interagiert sowohl mit pUL37 als auch mit pUL19 (McNabb und Courtney 1992; Klupp et al. 2001; Klupp et al. 2002). In Abwesenheit von pUL36 gelangen die Kapside zwar ins Zytoplasma, jedoch findet keine Tegumentation und sekundäre Umhüllung statt. Dieser Phänotyp ist unabhängig von der Interaktion mit dem nicht essentiellen pUL37 und deutet auf eine unabhängige Beteiligung von pUL36 bei der Virusmorphogenese hin (Klupp et al. 2002; Fuchs et al. 2004). Bislang konnten zwei funktionelle Regionen im UL36-Gen identifiziert werden, zum einen die pUL37-Interaktionsdomäne, zum anderen eine Deubiquitinierungsaktivität (Fuchs et al. 2004; Luxton et al. 2006).

Klupp et al. (2001) konnten zeigen, dass eine Deletion von pUL37 *in vitro* zwar zur Bildung intrazytoplasmatischer Kapsidaggregate führt und auch einen erheblichen Replikationsdefekt zur Folge hat, jedoch werden immer noch infektiöse Nachkommenviren produziert. Untersuchungen im Mausmodell weisen jedoch auf eine

essentielle Bedeutung dieses Proteins bei der Neuroinvasion hin (Klopffleisch et al. 2004).

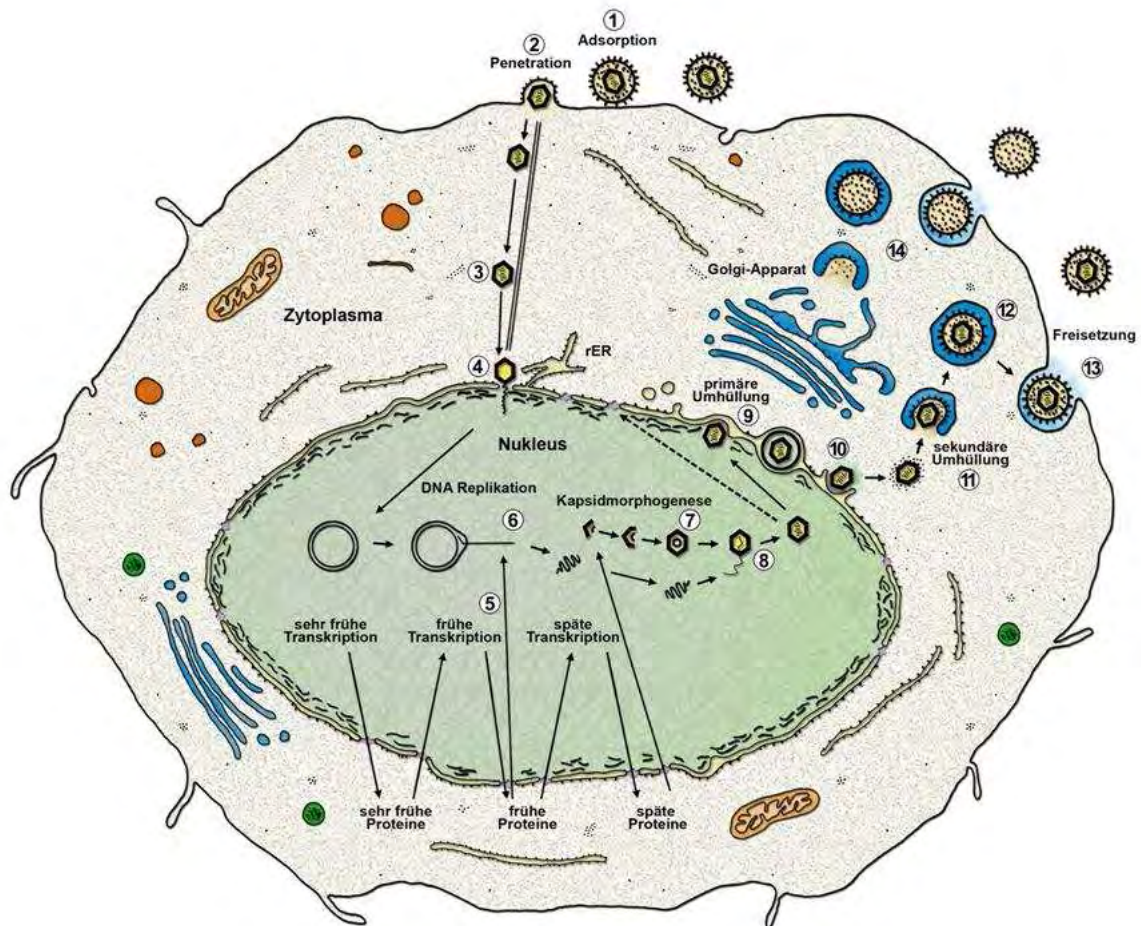


Abb. 2: **Schema zum Replikationszyklus des Pseudorabiesvirus.**

(1) Adsorption an die Zielzelle und (2) Penetration durch glykoproteinvermittelte Fusion der Virushülle mit der Plasmamembran. Anschließend kommt es zu einer Dissoziation von Teilen des Teguments in das Zytoplasma und zum (3) Transport der Kapside entlang der Mikrotubuli zu den (4) Kernporen. Im Zellkern finden die (5) Transkription der viralen Gene mit der Bildung von sehr frühen (immediate-early), frühen (early) und späten (late) Proteinen sowie die (6) Replikation des viralen Genoms statt. Nach autokatalytischem Zusammenbau der (7) Kapsidvorläufer und (8) Verpackung der viralen DNA kommt es zur primären Umhüllung an der inneren Kernmembran (9). Die primär umhüllten Nukleokapside im Kernspalt gelangen nach Fusion mit der äußeren Kernmembran ins Zytoplasma (10). Anschließend werden die Tegumentproteine angelagert und im Bereich des Trans-Golgi-Netzwerks kommt es zur sekundären Umhüllung (11). Die reifen Virionen werden in (12) Transportvesikeln zur Plasmamembran transportiert und durch Exozytose aus der Zelle freigesetzt (13).
Grafik: M. Jörn.

Die sekundäre Umhüllung findet im Bereich des Trans-Golgi-Netzwerks statt und wird durch die Interaktion von Tegumentproteinen mit Proteinen der künftigen Hülle vermittelt (Harley et al. 2001). Bei PrV interagiert pUL49 direkt mit den zytoplasmatischen Domänen von gE und gM (Fuchs et al. 2002c). Bei HSV-1 kommt es zu einer Interaktion von pUL48 mit gH, von pUL49 mit gD sowie von pUL13 mit gE (Ng et al. 1998; Gross et al. 2003; Chi et al. 2005).

Durch pUL48 werden die inneren und äußeren Anteile des Teguments wahrscheinlich miteinander verbunden. Bei Abwesenheit des Proteins bilden sich Ansammlungen von nackten Kapsiden im Zytoplasma, was auf eine Beteiligung von pUL48 bei der sekundären Umhüllung hindeutet (Zhu und Courtney 1994; Fuchs et al. 2002a).

Weiterhin konnten Arbeiten von Kopp et al. (2004) auch eine Beteiligung von pUL11 und gM an der sekundären Umhüllung nachweisen.

Die virushaltigen Vesikel werden zur Zelloberfläche transportiert und nach Fusion der Vesikelmembran mit der Plasmamembran gelangen die infektiösen Partikel nach außen. Das Membranprotein pUL20 ist an der Sortierung der reifen, umhüllten Virionen und deren Austritt aus der Zelle beteiligt (Fuchs et al. 1997).

2.2.3 PrV-Infektionen *in vivo*

PrV ist der Erreger der Aujeszkyschen Krankheit (AK) und in der Lage, viele Säugetierspezies zu infizieren. Ausgenommen von der Infektion sind höhere nichthumane Primaten sowie der Mensch. Die erstmalige Beschreibung des Erregers erfolgte 1902 durch ALADAR AUJESZKY. Dem ungarischen Tierarzt gelang es, den Erreger aus einem Rind, einem Hund und einer Katze zu isolieren. Durch seine Untersuchungen in Schweinen und Kaninchen fand er heraus, dass die Erkrankung klinisch der Tollwut ähnelte, worauf auch die Bezeichnung Pseudowut (Pseudorabies) beruht (Aujeszky 1902).

Das klinische Bild beim Schwein, dem natürlichen Wirt, variiert abhängig vom Alter der Tiere, der Virulenz des Erregers und der Infektionsroute (Gerds et al. 1997). Die Übertragung erfolgt durch virushaltige Körperflüssigkeiten überwiegend oronasal, aber auch genitale Infektionen sind beschrieben worden (Dieuzy et al. 1987). Die initiale Virusvermehrung erfolgt in den Epithelzellen, woran sich beim älteren Schwein eine virämische Phase mit ausgedehnter Organmanifestation anschließt. Klinisch stehen respiratorische Symptome im Vordergrund. Pathomorphologisch finden sich Nekrosen

der Parenchyme wie Lunge, Leber und Milz. Bei Saugferkeln kommt es dagegen eher zu einer neurogenen Virusausbreitung, die klinisch durch zentralnervöse Symptome wie Inkoordination, Ataxie, Konvulsionen und Paralysen gekennzeichnet ist. Ursache hierfür ist eine vorwiegend nichteitrige Panenzephalitis mit bis zu 100 % Mortalität. Die Latenzorte beim Schwein sind der *Bulbus olfactorius*, die Trigeminusganglien, der Hirnstamm, sowie nach venerischer Übertragung auch die Sakralganglien (Pomeranz et al. 2005). Bei trächtigen Sauen ist PrV in der Lage, Endometritis und Plazentitis auszulösen, wodurch es zum Abort oder zur Mumifikation der Feten kommen kann (Dieuzy et al. 1987).

Bei allen anderen empfänglichen Tierarten verläuft die Erkrankung zumeist perakut bis akut und in allen Fällen tödlich. Die Erregeraufnahme erfolgt meist alimentär durch infiziertes Fleisch oder oronasal durch virushaltige Sekrete. Nach der ersten Virusvermehrung in Epithelzellen erfolgt eine ausschließlich neurogene Virusausbreitung. Klinisch zeigen die Tiere schwere zentralnervöse Symptome mit starkem Juckreiz.

Nach intranasaler Infektion von Mäusen erfolgt eine erste Replikation in der respiratorischen Schleimhaut von Nase und Rachen. Das Virus gelangt dann über den *Nervus (N.) trigeminus* und über sympathische und parasympathische Nervenbahnen zum Trigeminusganglion sowie zu sympathischen und parasympathischen Neuronen (Abb. 3; Babic et al. 1994). Die neurogene Ausbreitung hat ein Leitungsbahn-assoziiertes Entzündungsmuster mit lymphohistiozytärer Ganglioneuritis und Meningoenzephalitis zur Folge. In infizierten Neuronen finden sich neben Kernwandhyperchromasie, Karyorrhexis und Karyolyse die typischen herpesviralen intranukleären Einschlusskörperchen vom Typ Cowdry A. In den Meningen und perivaskulär im Gehirn treten vorwiegend monozytäre Infiltrate und charakteristischerweise vereinzelt neutrophile Granulozyten auf (McFerran und Dow 1965).

Ein Einfluss des Immunsystems auf den tödlichen Verlauf konnte bislang nicht eindeutig nachgewiesen werden. Die bei Beta- und Gammaherpesviren beschriebenen Virokine konnten bei Alphaherpesviren nicht gefunden werden (Mettenleiter 1996). Eine Interaktion der Viren mit dem Immunsystem ist aber sehr wahrscheinlich. So bindet gC des PrV beim Schwein an Komplement C3 und der Komplex gE/gI bindet an den Fc-Rezeptor des porcinen IgG (Huemer et al. 1992; Zuckermann et al. 1988). Für das nicht essentielle gC des PrV konnte ebenfalls eine Rolle bei der zellvermittelten

Immunität gezeigt werden, es stellt einen Hauptangriffspunkt CD8⁺ T-Lymphozyten vermittelter Zytotoxizität dar (Zuckermann et al. 1990).

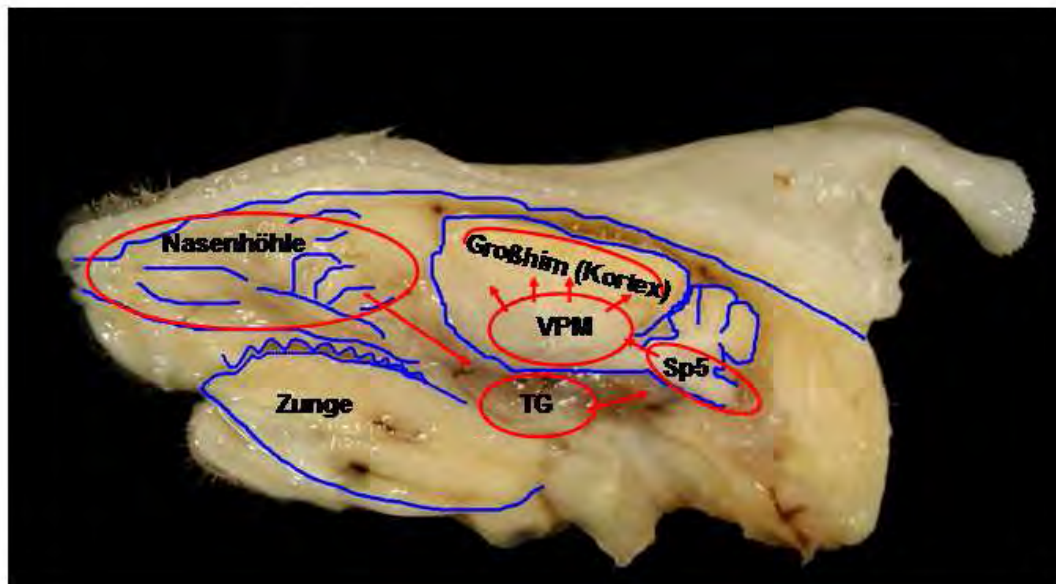


Abb. 3: Längsschnitt in der Medianebene vom Kopf einer Maus.

Die Nasenhöhle wird sensibel durch den *N. trigeminus* sowie durch sympathische, parasympathische und motorische Nervenfasern innerviert. Im *Ganglion trigeminale* (TG) finden sich die Neuronen erster Ordnung. Von dort kommt es zur Verschaltung auf Neuronen zweiter Ordnung im *Nucleus sensibilis pontinus n. trigemini* und *Nucleus tractus spinalis n. trigemini* (Sp5). Neuronen dritter Ordnung finden sich im *Nucleus ventroposteriomedialis thalami* (VPM). Von dort kann es zur Ausbreitung in den somatosensorischen Kortex kommen.

2.3 Neuroanatomische Grundlagen der Neuroinvasion und Neurovirulenz

Das Nervensystem wird in einen zentralen Anteil (ZNS) mit Gehirn und Rückenmark und einen peripheren Anteil (PNS) mit peripheren Nerven und Ganglien eingeteilt.

Funktionell werden die Neuroglia und die erregungsbildenden und -leitenden Nervenzellen unterschieden. Die Neuroglia umfasst unter anderem die Ependymzellen sowie Astrozyten, Mikroglia und Oligodendrozyten. Die Nervenzellen werden anhand ihrer abgehenden Fortsätze in pseudounipolare, bipolare und multipolare Neuronen unterschieden. Multipolare Nervenzellen besitzen ein Axon und zahlreiche Dendriten, die sich in unmittelbarer Nähe des Perikaryons verästeln. Das Axon unterscheidet sich vom Zellkörper und den Dendriten durch das Fehlen von rauem endoplasmatischem Retikulum. Anhand ihrer Funktion lassen sich motorische und sensorische Neuronen unterscheiden.

Der **Kopfbereich**, der als Eintrittspforte für Herpesviren eine besondere Rolle spielt, wird von den *Nn. trigeminus, facialis, olfactorius, glossopharyngeus* und *vagus* somatisch innerviert. Der *N. olfactorius* führt nur afferente, sensorische Fasern, während am Aufbau der anderen genannten Nerven sowohl sensorische als auch motorische Fasern beteiligt sind. Im Verlauf des *N. trigeminus* und des *N. facialis* sind sensorische Ganglien eingeschaltet, während der *N. glossopharyngeus* und der *N. vagus* neben sensorischen auch parasymphatische Ganglien besitzen.

Nach oraler Infektion von Mäusen mit HSV-1 kommt es u.a. auch zu einer Virusvermehrung in Neuronen des Trigeminalganglions sowie in neuronalen Zentren des Hirnstamms (Kristensson et al. 1982).

Der *N. trigeminus* ist der mächtigste Gehirnnerv und enthält einen motorischen Anteil, den *N. mandibularis*, der die *Mm. masseter* und *tensor veli palatini* innerviert. In dem sensiblen Anteil ist das *Ganglion trigeminale* eingeschaltet, das sich in der Schädelhöhle basal des *Rhombenzephalons* befindet. Im *Ganglion trigeminale* (TG) finden sich die Perikaryen der afferenten, sensiblen Nervenfasern mit Ausnahme der propriozeptiven Fasern, die ihre Perikaryen im *Nucleus tractus mesencephali n. trigemini* haben. Vom Ganglion zweigen die drei Hauptäste, der *N. ophthalmicus*, der *N. maxillaris* und der *N. mandibularis* ab. Der *N. ophthalmicus* verläuft zunächst eng mit dem *N. maxillaris* und verläßt im *Foramen orbitorotundum* die Schädelhöhle. Mit seinen Ästen, den *Nn. frontales, lacrimales* und *nasociliares*, innerviert er den Bereich der Augen und Stirnhaut und über den *N. nasociliaris* auch die Riechschleimhaut im Bereich des dorsalen Nasengangs und der dorsalen Nasenmuschel. Der *N. maxillaris* verläßt ebenfalls die Schädelhöhle im *Foramen orbitorotundum* und zieht dann zur *Fossa pterygopalatina*, wo er sich in die *Nn. zygomatici, pterygopalatini* und *infraorbitales* aufteilt. Mit seinen Fasern innerviert er die Schleimhäute des ventralen und mittleren Nasengangs, der Nasenmuscheln, des harten Gaumens und des Gaumensegels. Medial vom *N. maxillaris* liegt das *Ganglion pterygopalatinum* (GP), dem sympathische und parasymphatische Fasern zugeführt werden. Neben der motorischen Innervation versorgt der *N. mandibularis* über sensorische Fasern die Mundschleimhaut.

Die sensiblen trigeminalen Neuronen in den peripheren Ganglien werden als Neuronen erster Ordnung bezeichnet. Über ihre Axone, die als afferente Fasern in den *Pons* eintreten, treten sie in Kontakt zu Neuronen zweiter Ordnung im *Nucleus sensibilis pontinus n. trigemini* (Pr5), im *Nucleus mesencephali n. trigemini* (Me5) und im

Nucleus tractus spinalis n. trigemini (Sp5; Darian-Smith 1973). Im Sp5, der in einen oralen, interpolaren und kaudalen Anteil unterteilt wird, enden die afferenten Fasern der *Nn. trigemini, faciales, glossopharyngei* und *vagi*, die nach Eintritt in den *Pons* den *Tractus spinalis n. trigemini* bilden. Vom Sp5 kommt es zu einer weiteren Verschaltung in den *Nucleus ventroposteriomedialis thalami* (VPM), der seinerseits Signale zum somatosensorischen Kortex weiterleitet (Craig Jr. und Burton 1981; Dado und Giesler Jr. 1990; Yoshida et al. 1991).

Trigeminal Afferenzen projizieren jedoch auch direkt zu anderen Arealen, wie der *Formatio reticularis*. Das Retikularissystem ist an der Regulation vegetativer Zentren, der Aktivierung sensorischer Neuronen, der Steuerung des Schlaf-Wach-Rhythmus und an einer Beeinflussung des Kortex und subkortikaler Zentren beteiligt. Zudem wird der geregelte Ablauf von Reflexen gesteuert und in ihm sind die Kerne des Atmungs- und Kreislaufzentrums enthalten.

Der *N. facialis* besteht aus einem motorischen Anteil, dem *N. facialis* im engeren Sinne, und einem sensorischen und parasympathischen Anteil, dem *N. intermedius*. Er entspringt aus der *Medulla oblongata* und tritt in den *Canalis facialis* des Felsenbeins ein, das er durch das *Foramen stylomastoideum* wieder verlässt. Im *Canalis facialis* liegt das *Ganglion geniculi*, das die Perikaryen pseudounipolarer afferenter Neuronen enthält, die über den *N. intermedius* die vorderen zwei Drittel der Zunge innervieren. Aus dem *Nucleus parasympathicus n. intermedii* führt der *N. intermedius* efferente, parasympathische Fasern und aus dem *N. caroticus internus* erhält er sympathische Nervenfasern. Als VIDIscher Nerv führt er diese gemischten Fasern dem *Ganglion pterygopalatinum* zu. Die *Chorda tympani* führt als Bestandteil des *N. intermedius* präganglionäre, parasympathische Fasern zum *Ganglion mandibulare* und afferente Geschmacksfasern zum *Ganglion geniculi*. Der *N. intermedius* innerviert zudem alle Drüsen des Kopfes mit Ausnahme der Ohrspeicheldrüse. Nach Austritt aus dem *Foramen stylomastoideum* führt der *N. facialis* im Wesentlichen nur noch motorische Fasern, die nahezu die gesamte Kopfmuskulatur innervieren.

Der *N. glossopharyngeus* steht mit dem *N. vagus* und dem *N. accessorius* in enger Verbindung, weshalb die drei Gehirnnerven auch als „Vagusgruppe“ bezeichnet werden. Seinen Ursprung nimmt der Nerv zusammen mit dem *N. vagus* in der *Medulla oblongata*.

Die afferenten, sensorischen Wurzelzellen des *N. glossopharyngeus* liegen im *Ganglion distale glossopharyngei*. Deren Fortsätze bilden zusammen mit den afferenten Fasern

des *N. facialis* in der *Medulla oblongata* den *Tractus solitarius*, der im *Nucleus tractus solitarii* sowie im *Nucleus tractus spinalis n. trigemini* endet. Die motorischen Wurzelzellen finden sich im *Nucleus ambiguus* und die parasympathischen Fasern entspringen dem *Nucleus parasympathicus n. glossopharyngei*. Die sensiblen Wurzelzellen des *N. vagus* liegen vor allem im *Ganglion proximale*, zum Teil aber auch im *Ganglion distale*. Die afferenten Fortsätze enden zusammen mit dem *N. glossopharyngeus* in der *Medulla oblongata*. Die motorischen Wurzelzellen entspringen ebenfalls im *Nucleus ambiguus*. Die *Nn. glossopharyngei* und *vagi* innervieren die Rachenschleimhaut, die Tonsillen, die Drüsen der Backen-, Rachen- und Schlundkopfschleimhaut, die Schleimhaut und die Geschmacksknospen des hinteren Zungendrittels und den Schlundkopf.

In den Ganglien der genannten Gehirnnerven finden sich die Perikaryen der afferenten Wurzelsysteme. Im Bereich der *Medulla oblongata* und des *Pons* bilden die End- und Ursprungskerne der Gehirnnerven vier Kernreihen, die sich in somatische und viszerale Kerne unterscheiden lassen. Die absteigenden Äste der afferenten Fasern des *N. trigeminus*, des *N. facialis*, des *N. glossopharyngeus* und des *N. vagus* vereinigen sich zum *Tractus spinalis n. trigemini*, der kaudal im *Nucleus tractus spinalis n. trigemini* endet.

Durch unterschiedliche Infektionsrouten von PrV in Ratten konnten Card et al. (1990) mittels Immunhistologie neuronale Verschaltungen darstellen. Die Infektion der Zunge ergab positive Signale in motorischen Neuronen des *N. hypoglossus*, wohingegen eine Inokulation des PrV in Rachen und Ösophagus u.a. auch zu einer Infektion von Neuronen im *Nucleus posterior n. vagi* sowie im *Nucleus ambiguus* führte.

Das ***Ganglion cervicale craniale*** (SCG) bildet das vordere Ende des Grenzstranges und somit zusammen mit zahlreichen Nervenästen den Kopfteil des sympathischen Systems. Es liegt ventral des Hinterhauptbeines und in enger Nachbarschaft zur *A. carotis interna* und zum *Ganglion distale n. vagi*.

Die primäre Infektion der Haut von Säugern und die Ausbreitung über Nervenbahnen wurden sowohl bereits für HSV-1 als auch für PrV untersucht (Simmons und Nash 1984; Weeks et al. 2000; Brittle et al. 2004).

Die **Innervation des Rumpfes** erfolgt über das Rückenmark. Im Querschnitt lässt sich die *Fissura mediana ventralis* und das *Septum medianum dorsale* unterscheiden. Der zentrale, mit Ependym ausgekleidete Rückenmarkskanal wird von der grauen Substanz

(*Substantia grisea*) umgeben, die ihrerseits von der weißen Substanz (*Substantia alba*) vollständig umschlossen wird. Die Spinalnerven entspringen meist paarig mit zwei morphologisch und funktionell selbständigen Wurzeln. In jeder Rückenmarkshälfte treten dorsal in der *Radix dorsalis* die afferenten Fasern ein. Die Ventralwurzeln bestehen aus efferenten Neuronen und verlassen das Rückenmark in der *Radix ventralis*. Die Vereinigung der beiden Wurzeln zum *Truncus nervi spinales* geschieht im Bereich des Austritts aus dem Wirbelkanal. Unmittelbar vor der Vereinigung findet sich in der Dorsalwurzel das *Ganglion spinale*. Die graue Substanz teilt sich in ein Dorsal- und ein Ventralhorn und besteht vorwiegend aus Gliazellen und einer wechselnden Anzahl multipolarer Neuronen, die in Wurzel- und Binnenzellen unterschieden werden können. In der weißen Substanz liegen die von den Oligodendrozyten umschlossenen Axone.

Die Axone der pseudounipolaren Neuronen, deren Perikaryen sich im *Ganglion spinale* befinden, leiten als afferente oder sensible Nervenfasern Erregungen aus der äußeren Haut und den tieferen Körperregionen über die Dorsalwurzel ins Rückenmark. Die Axone enden entweder direkt an den motorischen, sympathischen oder parasympathischen Wurzelzellen der gleichen Seite oder sie ziehen zur Gegenseite. Aus der *Radix ventralis* verlassen efferente Nervenfasern das Rückenmark und leiten die Erregungsimpulse an die Erfolgsorgane weiter.

Der Grenzstrang, *Truncus sympathicus*, liegt als paariger Strang ventrolateral den Wirbelkörpern an. Er besteht beidseits aus einer Kette kleiner Knoten, den *Ganglia trunci sympathici*, auch Paravertebralganglien genannt.

Die erstmalige Kultivierung von Neuronen erfolgte Anfang des 20. Jahrhunderts durch Ross Harrison. Er nutzte für seine Untersuchungen neuronale Explantate von Amphibienembryonen (Harrison 1910). Mittlerweile lassen sich Neuronen aus fast allen Bereichen des Nervensystems isolieren und kultivieren (Banker und Goslin 1988). Die Identifizierung von Axonen und Dendriten kann durch spezifische Antikörper erfolgen. So ist es möglich GAP-43, ein membranassoziertes Phosphoprotein in Axonen, jedoch nicht in Dendriten nachzuweisen (Goslin et al. 1988).

Goodpasture und Teague (1923) beschrieben erstmals die Aufnahme von PrV durch Nervenendigungen und den retrograden axonalen Transport zum Zellkern.

Neuroinvasion bezeichnet die Fähigkeit von Viren, von der Peripherie ins Zentralnervensystem vorzudringen. Die Fähigkeit eine Erkrankung des Nervensystems

zu verursachen, wird als **Neurovirulenz** bezeichnet. Eine Reihe von Virusfamilien, wie *Picorna*-, *Rhabdo*-, *Toga*- und *Retroviridae* sind in der Lage, das ZNS vom peripheren Nervensystem aus oder über das Blut zu infizieren (Song et al. 2005). Alphaherpesviren besitzen zwar ebenfalls einen neurotrophen Charakter, sind jedoch in ihren natürlichen Wirten kaum neuroinvasiv (Minson et al. 2000; Roizman und Knipe 2001; Whitley und Gnann 2002). So kommt es nach einer ersten Virusvermehrung in Epithelien nur zur Ausbreitung in sensorischen Ganglien des PNS und zur Ausbildung einer lebenslangen reaktivierbaren latenten Infektion (Mueller et al. 2002). Eine transsynaptische Ausbreitung vom PNS zum ZNS ist selten, führt dann jedoch meist zur Ausbildung fatal verlaufender Enzephalitiden oder Myelitiden (Enquist et al. 1998; Hinson und Tyor 2001). Die Fähigkeit des PrV sich bevorzugt innerhalb neuronaler Leitungsbahnen über synaptisch verbundene Neuronen auszubreiten, hat ihm eine große Bedeutung als neuronaler Tracer verliehen (Mettenleiter 2008). Durch die Möglichkeit der Verwendung von attenuierten Virusmutanten, wie PrV-Bartha, die trotz eingeschränkter Virulenz eine ausgeprägte Neuroinvasion zeigen, stellt das PrV das am ausführlichsten beschriebene virale Tracingsystem dar (Enquist et al. 1998).

Der Transport der unbehüllten Viruskapside zum Zellkern erfolgt im Axon entlang der Mikrotubuli. So konnte gezeigt werden, dass durch Kolchizin, Nocodazol und Vinblastin, die eine Depolymerisierung der Mikrotubuli zur Folge haben, der axonale Virustransport beeinträchtigt wird (Kristensson et al. 1986; Topp et al. 1994). Das Zytoskelett der Axone besteht zu ca. 10% aus Mikrotubuli, die aufgrund ihrer polaren Struktur mit ihrem Plusende zur Synapse und ihrem Minusende zum Perikaryon hin orientiert sind (Ginzburg 1991; Fuchs und Cleveland 1998). Der schnelle intraaxonale Transport entlang der Mikrotubuli von der Axonendigung zum Zellkern wird über das zum Minusende wandernde Dynein-Motorprotein vermittelt und als retrograder Transport bezeichnet. Dementsprechend sind für den Transport in entgegengesetzter Richtung Kinesin-Motorproteine verantwortlich. Diese Transportrichtung wird als anterograd bezeichnet (Hirokawa 1998). Die Virusausbreitung von einem präsynaptischen infizierten Neuron auf ein postsynaptisches nichtinfiziertes Neuron wird in gleicher Analogie als anterograd, die Ausbreitung in umgekehrter Richtung als retrograd bezeichnet (Brideau et al. 2000). Die Proteine gE, gI und pUS9 sind für die anterograde transsynaptische Ausbreitung von Bedeutung (Enquist et al. 1998). Die Deletion eines der drei Proteine behindert die Ausbreitung von einem prä- auf ein postsynaptisches Neuron, nicht jedoch umgekehrt (Brideau et al. 2000; Ch'ng und

Enquist 2005a). pUS9 von PrV ist ein phosphoryliertes Typ-II-Membranprotein, das möglicherweise mit Kapsid- und Tegumentproteinen interagiert (Brideau et al. 1998). In bovinen Nierenzellkulturen beeinträchtigt eine Deletion des US9-Gens die Ausbreitung zwischen den Zellen nicht, jedoch führen Untersuchungen nach Infektion des Glaskörpers und Ausbreitung über den *N. opticus* von Ratten und in neuronalen Zellkulturen zu der Annahme, dass das Protein eine neuronenspezifische Funktion während der Replikation besitzt (Brideau et al. 2000; Ch'ng und Enquist 2005b). Tomishima und Enquist (2001) beschrieben für pUS9 des PrV eine Beteiligung an intraaxonalen Transportprozessen. Ihre Untersuchungen stützten die Ansicht, dass Kapside getrennt von der Hülle zur Synapse transportiert werden und pUS9 essentiell für den Transport viraler Glykoproteine, nicht jedoch von Kapsid- und Tegumentproteinen ist. Neuere Studien konnten jedoch für pUS9 auch eine Beteiligung am intraaxonalen Kapsidtransport nachweisen. So erfolgt bei PrV der Transport der einzelnen Virusbestandteile entlang der Mikrotubuli nicht getrennt, sondern zusammen in Vesikeln (Lyman et al. 2007). Die Glykoproteine gE und gI sind Typ-I-Membranproteine, die ein Heterodimer bilden (Whealy et al. 1993). Beide Proteine sind an der effizienten Ausbreitung von Zelle zu Zelle in nicht polarisierten Zellen beteiligt, spielen eine Rolle bei der anterograden transsynaptischen Ausbreitung in Neuronen sowie an der speziesspezifischen Bindung von IgG und sind wesentliche Determinanten der Virulenz (Jacobs et al. 1994). Trotz Deletion von gE kommt es *in vitro* immer noch zur Bildung von extrazellulären infektiösen Partikeln. Auch für gI konnte gezeigt werden, dass es nicht essentiell ist (Mettenleiter 2003).

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Virusstämme

Die verwendeten Virusstämme und deren Herkunft sind in Tab. 1 dargestellt.

Tab. 1: Übersicht über die verwendeten Virusstämme und deren Herkunft.

Name	Quelle
PrV-Kaplan	Kaplan und Vatter 1959
PrV-NIA3	Baskerville et al. 1973
PrV-Bartha	Bartha 1961
PrV- Δ UL3.5G	Fuchs et al. 2007
PrV- Δ UL3.5F	
PrV- Δ UL3.5/UL48	
PrV- Δ UL4	Fuchs et al. 2006
PrV- Δ UL7	Fuchs et al. 2005
PrV- Δ UL11/US3	Dr. B. Klupp, FLI
PrV- Δ UL13F/US3	Dr. B. Klupp, FLI
PrV- Δ UL14	Dr. W. Fuchs, FLI
PrV- Δ UL16/US3	Dr. B. Klupp, FLI
PrV- Δ UL20	Fuchs et al. 1997
PrV- Δ UL21	de Wind et al. 1992
PrV-UL21Ba	Klupp et al. 1995
PrV- Δ UL21/US3	Dr. B. Klupp, FLI
PrV- Δ UL24E	Dr. W. Fuchs, FLI
PrV- Δ UL25	Klupp et al. 2006
PrV- Δ UL35Resc	Krautwald et al. 2008
PrV- Δ UL35	
PrV-UL35GFP	
PrV- Δ UL36F	Fuchs et al. 2004
PrV-UL36(C ₂₆ S)R	Böttcher et al. 2008

PrV-UL36(C ₂₆ S)	
PrV-UL36Δ2087-2795	Böttcher et al. 2007
PrV-UL36Δ22-248	
PrV-UL36Δ748-991	
PrV-UL36Δ2087-2981	
PrV-UL36Δ22-248Δ2087-2981	
PrV-ΔUL37	Klupp et al. 2001
PrV-ΔUL39F	Dr. B. Klupp, FLI
PrV-ΔUL43	Klupp et al. 2005a
PrV-ΔUL46/US3	Dr. B. Klupp, FLI
PrV-ΔUL47/US3	Dr. B. Klupp, FLI
PrV-ΔUL48	Fuchs et al. 2007
PrV-gB ⁻	Nixdorf et al. 2000
PrV-ΔgE	Babic et al. 1996
PrV-ΔgK	Klupp et al. 1998
PrV-ΔgM	Dijkstra et al. 1997
PrV-gMBa	
PrV-ΔgNM	Dijkstra et al. 1996; Jöns et al. 1998
PrV-ORFGal	Baumeister et al. 1995
PrV-Ka/UL35GFP	Desai et al. 1998; Desai und Person 1998; Krautwald et al. 2008
PrV-Bartha/UL35GFP	
PrV-ΔUL37/UL35GFP	
PrV-ΔUS9/UL35GFP	
PrV-ΔUL11/UL35GFP	
PrV-ΔUL48/UL35GFP	
PrV-ΔgE/UL35GFP	
PrV-ΔUL11/US9/UL35GFP	
PrV-UL36(C ₂₆ S)/UL35GFP	

3.1.2 Zelllinien

CCLV-RIE 109

RK13, Nierenzelllinie, Kaninchen (Zellbank FLI)

CCLV-RIE 985

RK13 transfiziert mit pcDNA-UL21 (Dr. B. Klupp, FLI)

CCLV-RIE 832 RK13 transfiziert mit einem Plasmid, dass das BamHI Fragment 4 von PrV-Kaplan enthält (Dr. B. Klupp, FLI)

3.1.3 Versuchstiere

CD-1 Mäuse	Charles River WIGA
Hausschweine	Landwirtschaftsbetrieb e.G., Schwasdorf
Wildschweine	Eigene Nachzucht FLI
CrI:CD(SD) Ratten	Charles River WIGA

Die Mäuse und Ratten wurden in Gruppen oder einzeln in Käfigen gehalten, bei den Haus- und Wildschweinen erfolgte Gruppenhaltung. Das Lichtregime beinhaltete einen Wechsel von Hell- und Dunkelphasen im Abstand von 12 h. Alle Tiere hatten jederzeit Zugang zu frischem Wasser. Die Mäuse und Ratten erhielten *ad libitum* Futter (ssniff® Futtermittel für Ratten und Mäuse), während die Schweine einmal am Tag mit pelletiertem Vormastfutter (Getreide AG) gefüttert wurden.

3.1.4 Enzyme

Restriktionsenzyme	Roche, Invitrogen, NEB Promega
Proteinase K	Roche
RNase A	Sigma
Taq-Polymerase	Roche

3.1.5 Seren und Antiseren

Ziegenserum: Frischblut aus Ziegen wurde zur Spontangerinnung bei 4 °C über Nacht stehen gelassen, anschließend für 10 min bei 3000 Umdrehungen pro Minute (UpM) zentrifugiert und der Überstand bei -20 °C gelagert.

PrV UL19-Antiserum: Zum Nachweis des PrV-Hauptkapsidproteins pUL19 wurde als Primärantikörper ein von Dr. B. Klupp, FLI (Klupp et al. 2000) zur Verfügung gestelltes Kaninchen-anti-PrV UL19 Serum (1:750) verwendet.

GFAP-Antikörper: Zum Nachweis von Astrozyten in der Neuronenkultur kam ein Kaninchen-anti-bovines gliales fibrilläres saures Protein (GFAP)-Antiserum (1:100, Dako) zum Einsatz.

Anti-Tubulin-Antikörper: Der Nachweis von murinen Neuronen in der primären Zellkultur wurde mit einem Maus-anti- β III-Tubulin-Antiserum (1:50, Chemicon) durchgeführt.

Kontrollseren: Als Kontrolle wurde Serum eines nicht mit PrV infizierten Kaninchens verwendet.

Sekundäre Antikörper: Als sekundäre Antikörper fanden ein biotinyliertes Ziege-anti-Kaninchen-Antiserum (1:200, Vector), ein biotinyliertes Ziege-anti-Maus-Antiserum (1:200, Vector) sowie ein Ziege-anti-Maus IgG-Antiserum (Alexa Fluor[®], 1:1000, Mo Bi Tec) Verwendung.

3.1.6 Chemikalien, Kits und Arzneimittel

1,4-diazabicyclo[2.2.2]-octane (DABCO)	Sigma
3-Amino-9-ethyl Carbazol-staining reagent (AEC)	Dako
Agarose	Gibco BRL
Aquatex [®]	Merck
Blood & Cell Culture DNA Mini Kit [®]	Qiagen
Bovines Serum Albumin	Sigma
DIG-markierte dNTPs	Roche
DMEM/F12 (1:1)	Gibco BRL
DNA-Längenstandard „1kb-ladder“	Invitrogen
dNTPs	Promega
EDTA freie Säure	Sigma
Eosin G 15935	Merck
Ethanol 99,8 %	Roth
Ethidiumbromid	Serva
Eukitt [®] (Corbit-Balsam)	Inge Hecht
Formaldehyd mind. 37%, säurefrei, 3999	Merck
Glukose	Gibco BRL
Hämatoxylin, 4302	Merck
HBSS mit Kalzium/Magnesium	Fisher Scientific

HBSS ohne Kalzium/Magnesium	Fisher Scientific
Hochvakuumfett	Lippold GmbH
Insulin	Sigma
Isofluran	cp-pharma
Kanamycin	Gibco BRL
Ketamin 10 %	Ceva
L-Glutamin	Invitrogen
Methanol reinst, 6008	Merck
Nerve Growth Factor (NGF) 2,5S	Invitrogen
Paraffin-Paraplast (Histosec)	Merck
PCR-Puffer	Roche
Penicillin-Streptomycin	Gibco BRL
Progesteron	Sigma
Puffer pH 11.00 (H ₃ BO ₃ , NaOH, KCl)	Sigma
Qualitätswasser für Zellkultur	Fisher Scientific
QuantiTect Multiplex PCR Master Mix	Qiagen
Rompun 2 %	Bayer
Roti [®] -Histol, 6640	Roth
SDS	Serva
Selen	Sigma
Saponin	Fluka
Tetramethyldiamin dihydrochlorid (Putrescin)	Sigma
Transferrin	Sigma
Tris	Invitrogen
Trypsin	Worthington
Trypsin-Inhibitor	Sigma
Vectastain [®] ABC Kit, Inc.	Vector
Vybrant [®] DiI	Invitrogen
Zoletil [®]	Virbac
Alle weiteren Chemikalien wurden von den Firmen Sigma, Merck, Serva, Invitrogen oder Roth bezogen.	

3.1.7 Geräte und Instrumente

Es sind nur die über die Laborgrundausrüstung hinausgehenden Geräte aufgeführt.

„Mastercycler Gradient“	Eppendorf
Axioskop 2 Fluoreszenz	Zeiss
Eppendorf Thermomixer 5436	Eppendorf
Hybridisierungsöfen	Biometra
Kamera am Axioskop3 CCD	Sony
Konfokales Laser Scan Mikroskop LSM510	Zeiss
Mikrodissektionsmesser	Hugo Sachs Elektronik
MX3000P™ real-time PCR Cycler	Stratagene
Phospho-Imager mit Bas Kassette 2325	Fujifilm
Spektrometer Du 640	Beckmann
Teflonring CAMP3	Tyler Research
Teflonring CAMP320	Tyler Research
UV Crosslinker Stratalinker 1800	Stratagen

3.1.8 Verbrauchsmaterial

Aclar®-Fluoropolymer Film	Sciences Services
Chromatographiepapier 3MM	Whatman
Deckgläschen, rund, 12 mm	Matthias Schmehl
Filme	Kodak
Filter 0,22 µm	Millipore
Hyperfilm®	Amersham Biosciences
Nylonmembran (Hybond-N+)	Amersham-Biosciences
Objektträger (Super frost® plus)	Menzel-Gläser
Objektträger (Super frost®)	Menzel-Gläser
Petrischalen µ-Dish	ibidi
Petrischalen Steriplan®	Roth
Reaktionsgefäße	Eppendorf
Zellkulturflaschen	Corning
Zentrifugalkonzentratoren Vivaspin 20	Sartorius Stedim Biotech

3.1.9 Stammlösungen und Puffer

Zellkultur und Transfektion

Zellkulturmedium ZB 5

MEM Eagle mit Hanks-Salzen und MEM Eagle mit Earle-Salzen im Verhältnis

1:1

10 ml nicht essentielle Aminosäuren

120 mg Natrium-Pyruvat

10 % fetales Kälberserum (FKS)

ad 1000 ml Aqua dest.

Zellkulturmedium ZB 5b

MEM Eagle mit Hanks-Salzen und MEM Eagle mit Earle-Salzen im Verhältnis

1:1

10 ml nicht essentielle Aminosäuren

120 mg Natrium-Pyruvat

5 % fetales Kälberserum (FKS)

ad 1000 ml Aqua dest.

Methozel-Medium

109 g Methylzellulose

3,76 g MEM Eagle

in 390 ml Aqua dest. lösen, autoklavieren

0,88 g NaHCO_3 in 6 ml PBS

4 ml Glutamax

ad 1000 ml Aqua dest.

sterilfiltrieren, Gebrauchsverdünnung 1:4 in Zellkulturmedium 5b

Alsevers Trypsin Versen (ATV)

8 g NaCl

0,4 g KCl

1 g Dextrose

0,58 g NaHCO_3

0,2 g EDTA

0,5 g Trypsin
ad 1000 ml Aqua dest.

Zellkulturmedium für Neuronen

40 ml DMEM/F12 (1:1)
400 mg bovines Serumalbumin (BSA)
400 µl Glukose (460 mg/ml)
400 µl Transferrin (10 mg/ml)
400 µl Putrescine (1,6 mg/ml)
400 µl Insulin (1 mg/ml)
400 µl Glutamin (200 mM)
200 µl Penicillin-Streptomycin (50 µg/ml)
200 µl Kanamycin (10 mg/ml)
40 µl Selen (30 µM)
12 µl Progesteron (66,7 µM)
20 µl Nerve Growth Factor 2,5S (100 µg/ml)
sterilfiltrieren.

Zitratpuffer

3,94 g NaCl
4,2 g Zitronensäure
0,372 g KCl
ad 500 ml Aqua dest., pH 3,0; sterilfiltrieren

Fluoreszenzerhaltungspuffer (DABCO)

2,5 g 1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan
90 ml Glycerol
10 ml PBS
ad 100 ml Aqua dest.

20 x Pronasepuffer

11,69 g NaCl,
2,43 g Tris-HCl
ad 100 ml Aqua dest., pH 7,2

Pronase

500 mg Pronase
in 100 ml 5 x Pronasepuffer

2 x HBS

5,96 g Hepes
0,134 g Na_2HPO_4
8,18 g NaCl
ad 500 ml Aqua dest.

TEN

10 ml 0,5 M Tris-HCl, pH 7,4
1 ml 0,5 M Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)
15 ml 5 M NaCl
ad 500 ml Aqua dest.

Sarkosylpuffer

7,5 ml 1 M Tris-HCl, pH 8,3
10 ml (25 mM) EDTA, pH 8,0
30 ml Sarkosyl
ad 100 ml Aqua dest.

RNase

5 mg RNase
50 μl Tris-HCl, pH 7,5
30 μl NaCl
ad 10 ml Aqua dest., im Wasserbad 15 min erhitzen.

50 x EP-Puffer

484,6 g Tris
68,0 g Natriumacetat
37,2 g EDTA
ad 2000 ml Aqua dest., mit HCl auf pH 7,2 einstellen

Agarosegel 0,8 %

0,8	g	Agarose
100	ml	1 x EP-Puffer

Kristallviolett 1 %

1	g	Kristallviolett
50	ml	Ethanol
50	ml	Aqua dest.

0,5 M EDTA

186,12	g	Na ₂ EDTA·2H ₂ O
700	ml	1 M Tris-HCl, pH 8,3
50	ml	10 M NaOH
auf pH 8,0 einstellen		
ad 1000 ml Aqua dest., autoklavieren		

10 x Tris-Borat-EDTA (TBE)-Elektrophoresepuffer

108	g	Tris, pH 8
55	g	Borsäure
40	ml	0,5 M EDTA
ad 1000 ml Aqua dest.		

Agarosegel 1,5 %

1,2	g	Agarose
80	ml	0,5 x TBE-Puffer
10	µl	Ethidiumbromid

50 x Tris-Azetat-EDTA (TAE)-Puffer

242	g	Tris
20	g	Natriumazetat
57,1	ml	Eisessig
100	ml	0,5 M EDTA, pH 8
ad 1000 ml Aqua dest.		

Southern Blot

20 x SSC-Puffer

175,32 g NaCl
88,23 g tri-Natriumzitat-Dihydrat
ad 1000 ml H₂O, mit HCl auf pH 7,0 einstellen

20 x SSPE

175,3 g NaCl
27,6 g NaH₂PO₄
7,4 g EDTA
ad 1000 ml H₂O, pH 7,4

Vorhybridisierungslösung

80 ml 20 x SSPE
40 ml Magermilch 10%
20 ml Heringssperma DNA in H₂O (10 mg/ml)
40 ml SDS 10 %
200 ml Formamidation
20 ml H₂O

Hybridisierungslösung

Vorhybridisierungslösung
+ ³²P markierte Sonde

Western Blot

10 % Trenngel

0,1 ml SDS 10%
2,5 ml 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8
3,33 ml Acrylamid (30 %)
4,0 ml H₂O
10 µl Tetramethylethylendiamin (TEMED)
50 µl Ammoniumpersulfat (10 %)

3 % Sammelgel

0,05	ml	SDS 10%
1,25	ml	0,5 M Tris-HCl, pH 6,8
0,65	ml	Acrylamid (30 %)
3,05	ml	H ₂ O
10	µl	Tetramethylethyldiamin (TEMED)
50	µl	Ammoniumpersulfat (10 %)

10 x PAGE Puffer

30,3	g	Tris
141,1	g	Glycin
ad 1000 ml H ₂ O		

SDS-Probenpuffer

11,25	ml	Tris-HCl, pH 6,8
18	ml	SDS 10%
9	ml	Glycerin
4,5	ml	2-Mercaptoethanol
Spatelspitze		Bromphenolblau

SDS-Laufpuffer

200	ml	10 x PAGE Puffer
20	ml	SDS 10%
1800	ml	H ₂ O

Transferpuffer

500	ml	10 x PAGE Puffer
500	ml	Methanol
4000	ml	H ₂ O

20 x TBS-T-Puffer

100	ml	0,5 M Tris-HCl, pH 7,6
87,6	g	NaCl
10	ml	Tween 20

ad 500 ml Aqua dest.

Histopathologische Untersuchungen

10 % Neutral gepuffertes Formalin (pH 7,3)

4	g	NaH ₂ PO ₄
6,5	g	Na ₂ HPO ₄
900	ml	Aqua dest.
100	ml	Formaldehyd 37 %

4 % Neutral gepuffertes Paraformaldehyd (pH 7,3)

40	g	Paraformaldehyd
1000	ml	1 x PBS
bei 70 °C unter Rühren lösen.		

Eosin/Phloxin

20	ml	Eosin (1 %)
2	ml	Phloxin (1 %)
156	ml	Ethanol
0,8	ml	Eisessig

Hämalaun (n. Mayer)

1	g	Hämatoxylin
1000	ml	H ₂ O
200	mg	NaJO ₃
50	g	Kaliumalaun
schütteln bis blauviolette Lösung		
50	g	Chloralhydrat
1	g	Zitronensäure
Farbumschlag zu rotviolett		

20 x PBS

29,25	g	Na ₂ HPO ₄
160	g	NaCl
4	g	KCl

4,9 g KH_2PO_4
ad 1000 ml H_2O , pH 7,3

10 x TBS

60,57 g Tris-HCl
80,0 g NaCl
in 500 ml H_2O lösen,
mit HCl auf pH 7,65 einstellen

Tris-EDTA(TE-)-Puffer

5 ml 1 M Tris-HCl, pH 8,0
1 ml 0,5 M EDTA
ad 500 ml H_2O

Heringssperma-DNA (10 mg/ml)

250 mg Heringssperma-DNA
25 ml TE-Puffer (pH 8,0)

50 x Denhardts Lösung

1 g Polyvinylpyrrolidon (PVP)
1 g BSA
1 g Ficoll 400
ad 100 ml H_2O

50 x Dextransulfat

10 g Dextransulfat
ad 20 ml H_2O

400 x Levamisol

96 mg Levamisol
1 ml H_2O
lösen, in 100 μl Aliquots bei -20°C lagern.

2 x Puffer I

200 ml 1 M Tris-HCl (pH 7,5)
60 ml 5 M NaCl
ad 1000 ml H₂O

Puffer III

25 ml 1 M Tris-HCl (pH 9,5)
5 ml 5 M NaCl
12,5 ml 1 M MgCl₂
ad 250 ml H₂O

3.2 Methoden

3.2.1 In-vitro-Untersuchungen

3.2.1.1 Kultivierung von nichtneuronalen Zellen

Die Kultivierung der verschiedenen Zelllinien erfolgte in Plastikgewebekulturflaschen in feuchter Atmosphäre bei 37 °C und 5 % CO₂. Nach Ausbildung eines konfluenten Monolayers wurden die Zellen umgesetzt, indem sie nach Entfernung des Mediums mit einer Alsevers Versen Trypsin-Lösung bei 37 °C bis zur Ablösung inkubiert wurden. Die Zellen wurden anschließend in einem Verhältnis von 1:4 bis 1:5 in Medium aufgenommen und in neue Kulturgefäße verbracht.

3.2.1.2 Transfektion

Für die Transfektion wurde die Kalzium-Phosphat-Methode genutzt. Dazu wurde die zu transfizierende Plasmid-DNA mit 10 mM Tris-HCl (pH 7,4) auf 438 µl aufgefüllt, mit 62 µl 2M CaCl₂ und 500 µl 2x Hepes Buffered Saline (HBS) versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei Raumtemperatur bildete sich ein weißer Niederschlag. Dieser wurde nach Absaugen des Überstandes auf die Zellkulturen gegeben (500 µl pro Vertiefung einer 6-Loch-Zellkulturplatte) und für 4 h bei 37 °C inkubiert. Zur Erhöhung der Transfektionseffizienz wurden die Zellen mit 15 % Glycerol in HBS für 2 min inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen in Zellkulturmedium 5 weiter bei 37 °C inkubiert.

3.2.1.3 Virusanzucht

Die Vermehrung der Deletionsmutante PrV- Δ UL21/US3 erfolgte auf der Zelllinie 832. Nach Ausbildung eines Monolayers wurden die Zellen infiziert und bis zur Ausbildung eines kompletten zytopathogenen Effektes bei 37 °C inkubiert. Einem anschließenden Gefriervorgang bei -70 °C zur vollständigen Lyse folgte das erneute Auftauen und eine Zentrifugation für 5 min bei 4000 UpM. Zur Konzentrierung wurde der Überstand erneut bei 4000 UpM für 90 min mit Zentrifugalkonzentratoren (Vivaspin 20) zentrifugiert. Nach Entfernung und Portionierung des virushaltigen Überstandes wurde das Zellpellet in 1 ml TEN resuspendiert. Das Zellpellet wurde zur Isolierung von Virus-DNA, wie unter Punkt 3.2.1.6 beschrieben, weiterbearbeitet.

3.2.1.4 Plaquetest

Zur Titerbestimmung wurden logarithmische Verdünnungsreihen der Virussuspensionen in Zellkulturmedium 5b hergestellt und auf die Zelllinien 109 und 832 in 24-Loch-Zellkulturplatten gegeben. Nach einer Inkubation von 1 h bei 37 °C wurde das Inokulum durch 0,25 x Methozel-Medium ersetzt. Es folgte eine weitere zweitägige Inkubation bei 37 °C. Nach Fixierung mit 5 % Formaldehyd für mindestens 20 min wurden die Zellen kurz (30 sec) mit 1 % Kristallviolett gefärbt. Durch Auszählen der Plaques wurde der Gehalt an infektiösen Viruspartikeln bestimmt und als „Plaque Forming Units“ (PFU/ml) angegeben. Anschließend wurden pro Verdünnungsreihe 30 Plaques mikroskopisch vermessen und die Plaquegrößen in drei voneinander unabhängigen Experimenten bestimmt.

3.2.1.5 Kinetik

Zur Bestimmung der Wachstumskinetik verschiedener Virusmutanten wurden 24-Loch Zellkulturplatten mit den entsprechenden Zellen auf 0 °C vorgekühlt und anschließend nach Zugabe der Virusmutanten für 1 h bei 4 °C inkubiert. Die Infektion erfolgte mit Virussuspensionen bekannten Titers für 1 h bei 37 °C. Anschließend wurden die Zellen mit Zitratpuffer (pH 3,0) behandelt, um extrazellulär vorhandenes Virus zu inaktivieren. Zu verschiedenen Zeiten nach der Infektion wurden der Überstand und die Zellen geerntet und bei -70 °C eingefroren. Die Bestimmung des Virustiters erfolgte wie unter Punkt 3.2.1.4 beschrieben.

3.2.1.6 DNA-Isolierung

Für die DNA-Isolierung wurde das unter Punkt 3.2.1.3 gewonnene Zellpellet verwendet. Zu dem in 1 ml TEN gelösten Pellet wurden 500 µl Sarkosylpuffer zugefügt und für 15 min bei 65 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 10 µl RNase (5 mg/ml) und eine erneute Inkubation für 30 min bei 37 °C. Im nächsten Schritt wurden 400 µl Pronase (5 mg/ml) zugegeben und 2 h bei 45 °C inkubiert. Die Isolierung der DNA wurde mittels der Phenol-Chloroform-Methode durchgeführt. Dazu wurden 2 ml Phenol zugefügt und für 4 Min zentrifugiert. Alle Zentrifugationsschritte erfolgten bei 3000 UpM und 4 °C. Die obere, wässrige Phase wurde in ein neues Röhrchen überführt und 2 ml Phenol/Chloroform hinzugefügt. Es folgte eine erneute Zentrifugation für 4 Min. Die obere Phase wurde wiederholt in ein neues Röhrchen überführt und 2 ml Ether zugesetzt. Nach der Zentrifugation für 2 min wurde die Etherphase abgenommen und verworfen. Zu der verbleibenden Phase wurden 200 µl Natriumazetat (3M, pH 5,2) und 6 ml Ethanol zugegeben. Anschließend erfolgte die Fällung der DNA für mindestens 30 Min bei -70 °C. Eine anschließende Zentrifugation für 30 Min erfolgte bei 6000 UpM und 4 °C. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet getrocknet und anschließend in 50 µl Aqua dest. resuspendiert.

3.2.1.7 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Zur Bestimmung der Konzentration und Reinheit der Nukleinsäure wurden in einem Photometer UV-Absorptionsspektren (220-320 nm) aufgenommen. Aus der Extinktion bei 260 nm konnte die Konzentration folgendermaßen berechnet werden:

$$\text{OD}_{260} \times 50 \times \text{Verdünnungsfaktor} = \mu\text{g/ml dsDNA.}$$

Die Reinheit der Nukleinsäure wurde über den Quotienten $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ bestimmt, wobei die Werte zwischen 1,8 und 2,0 liegen sollten. Ein Wert unter 1,8 deutet auf eine Verunreinigung mit Proteinen hin.

3.2.1.8 DNA-Spaltung mit Restriktionsenzymen

Für die DNA-Spaltungen wurden je nach eingesetztem Restriktionsenzym die vom Hersteller angegebenen Puffer und Temperaturbedingungen gewählt. Pro Spaltung wurden 2-10 U Enzym/µg DNA eingesetzt.

3.2.1.9 DNA-Agarosegelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung der DNA erfolgte in horizontalen 0,8 % Agarosegelen. Die Agarose wurde durch Erhitzen in 1 x TAE-Puffer gelöst, mit 0,3

µg/ml Ethidiumbromid versetzt und zu 5 mm starken Gelen gegossen, welche nach Erstarren in Elektrophoresekammern mit 1 x TAE-Puffer bedeckt wurden. Die mit 10 % Probenpuffer versetzten Proben wurden bei 35-80 V aufgetrennt. Nach dem Lauf konnten die DNA-Fragmente aufgrund des eingelagerten Ethidiumbromids als fluoreszierende Banden unter UV-Licht (256 nm) sichtbar gemacht werden. Die Größenbestimmung erfolgte anhand eines mitgeführten Standards (1 kbp-Marker).

3.2.1.10 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur gezielten DNA-Amplifizierung wurde die Polymerase-Kettenreaktion verwendet. Ein PCR-Ansatz von 25 µl enthielt 5 µl 10x PCR-Puffer (Promega), je 1,25 µl der entsprechenden Oligonukleotide (Primer), je 200 µM dATP, dGTP, dCTP und dTTP, 0,5 mM MgCl₂, 1 U Taq-Polymerase, 5 µl 10x PCR-Enhancer (Invitrogen) und H₂O. Die Proben wurden in 33-40 Zyklen amplifiziert. Nach einer einmaligen Denaturierung von 2 min bei 95 °C folgten Zyklen zur DNA-Denaturierung für je 30 s bei 95 °C, zur Anlagerung der Primer für je 45 s bei der jeweiligen Annealingtemperatur und zur Verlängerung für jeweils 60 s bei 72 °C. Zum Abschluss folgte ein 5-7 min Inkubationsschritt bei 72 °C zum Vervollständigen der DNA-Synthese. Als Kontaminationskontrolle wurde ein Ansatz ohne Matrizen-DNA mitgeführt. Die Überprüfung der PCR-Reaktion erfolgte durch Gelelektrophorese von 5 µl PCR-Ansatz in einem 1,5 % Agarosegel.

3.2.1.11 Real-Time PCR zum Nachweis von PrV

Die Real-time PCR diente dem Nachweis von PrV-DNA in Organproben. Die Aufbereitung der Organe wurde mit dem Blood & Cell Culture DNA Mini Kit[®] (Qiagen) entsprechend des „Genomic-tip“ Protokolls durchgeführt. Die Amplifizierung der PrV-DNA erfolgte auf Basis des QuantiTect Multiplex PCR NoROX Kits (Qiagen). Für einen Ansatz wurden 10 µl 2x QuantiTect Multiplex PCR Master Mix, 2 µl PRV1-UL19-Mix-FAM und 7 µl RNase freies Wasser verwendet. Die Primer-Sonden-Mischung wurde von Herrn Dr. B. Hoffmann (FLI) entwickelt. Nachfolgend sind die eingesetzten Primer- und Sondensequenzen und deren Konzentrationen aufgeführt:

PRV1-UL19-Mix-FAM:

PrV-UL19-1871F (0,8 µM)	5'-CGC AGT GCA TCC AGA GCT AC-3'
PrV-UL19-1966R (0,8 µM)	5'-CGT TGC CCA GGT AGG TGT TG-3'
PrV-UL19-1894FAM (0,2 µM)	5'-FAM-CGC AAC ACG CAC AAC GCC GCC-TAMRA-3'

Der Mastermix wurde vorsichtig gemischt und 1 µl isolierte DNA hinzugefügt. Die Real-time PCR wurde an einem MX3000P™ real-time PCR Cycler der Firma Stratagene durchgeführt und startete mit der Aktivierung der Taq-Polymerase für 15 min bei 95 °C. Es folgten 42 Zyklen bestehend aus Denaturierung (60 sec, 95 °C), Anlagerung (30 sec, 58 °C) und Verlängerung (30 sec, 72 °C). Die Auswertung der Daten erfolgte anhand von Fluoreszenzwerten, die während der Anlagerungsphase gesammelt wurden.

3.2.1.12 Southern-Blot-HybridisierungTransfer auf Nylonmembran

Die in einem Ethidiumbromid-gefärbten 0,8 % Agarosegel elektrophoretisch getrennten DNA-Fragmente wurden zusammen mit einem Größenstandard auf dem Tansilluminator visualisiert und dann zum Entfärben für einige Zeit in H₂O geschwenkt. Anschließend wurde das Gel für 10 min mit 0,25 N HCl sowie dreimalig mit H₂O gewaschen. Zur Denaturierung der DNA wurde das Gel 2 x 15 min in 0,5 M NaOH/0,9 M NaCl geschwenkt, dreimal mit H₂O gespült und für 2 x 30 min in 0,9 M NaCl/1 M Tris-HCl (pH 7,4) gelegt. Auf eine mit 250 ml 12 x SSC gefüllte Wanne wurde eine Glasplatte gelegt. Über diese wurde ein Filterpapier positioniert, so dass die beiden Enden in die Lösung reichten. Auf das Filterpapier wurden das Gel, eine gewässerte Nylonmembran sowie drei feuchte Filterpapiere gelegt. Nach Entfernung der Luftblasen wurde ein ca. 10 cm hoher Zellstoffstapel sowie zur Beschwerung eine Glasplatte und ein Gewicht aufgelegt. Der Transfer wurde über Nacht durchgeführt und am nächsten Tag erfolgte eine Vernetzung der auf die Nylonmembran übertragenen Nukleinsäuren mittels UV-Bestrahlung (Stratalinker).

Herstellung ³²P-markierter DNA-Sonden

Die Markierung von DNA-Fragmenten erfolgte mit dem „Rediprime II Random Prime Labeling System“ nach Angaben des Herstellers. Hierbei wurden 50 ng Template-DNA in 45 µl H₂O 5 min bei 100 °C erhitzt, 5 min auf Eis gekühlt, zu dem vorgefertigten

Rediprime Mix pipettiert und anschließend 5 µl ^{32}P markiertes dCTP zugegeben. Der Markierungsansatz wurde für 30 min bei 37 °C inkubiert und anschließend durch Zugabe von 0,5 µl 0,5 M EDTA gestoppt. Die radioaktiv markierte Sonde wurde vor Zugabe zu der Membran für 5 min bei 95 °C denaturiert.

Hybridisierung von Nukleinsäuren

Es erfolgte die Hybridisierung der gebundenen viralen DNA mit den ^{32}P -markierten Sonden. Zunächst wurde die Nylonmembran im Hybridisierungsrohr mit 15 ml Hybridisierungslösung für 4 h bei 68 °C vorinkubiert. Anschließend wurde die radioaktive Sonde zugegeben und es erfolgte eine erneute Inkubation bei 68 °C über Nacht. Nach der Hybridisierung erfolgten Waschungen der Membran zur Entfernung unspezifisch gebundener radioaktiv markierter Sonde mit 2 x SSC-Puffer/0,5 % SDS für 2 x 30 min und mit 0,1 x SSC/0,5 % SDS für 3 x 20 min bei jeweils 72 °C. Nach Trocknung auf Filterpapier wurde die Membran in einer Kassette mit Bildplatte für mind. 4 h exponiert und die Radioaktivität mittels eines Phospho-Imagers quantifiziert.

3.2.1.13 Western Blot

SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Der Nachweis von Proteinen aus infizierten und nicht infizierten Zellen erfolgte nach elektrophoretischer Auftrennung in diskontinuierlichen Polyacrylamidgelen über Immundetektion nach Transfer auf eine Nitrozellulosemembran. Die aus 6-Loch-Gewebekulturschalen stammenden Proben wurden in 200 µl SDS-Probenpuffer mit 5 % Merkaptoethanol für 5 min bei 95 °C denaturiert. Anschließend wurden 10 µl pro Gelspur eines Proteinminigels aufgetragen. Die Auftrennung der Proteine in dem Gel, das aus einem 10 % Trenn- und einem 3 % Sammelgel bestand, erfolgte in SDS-Elektrophoresepuffer für ca. 45 min bei 200 V, bis der Bromphenolblaumarker das Gel vollständig durchlaufen hatte.

Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen

Die aufgetrennten Proteinproben wurden anschließend durch Elektroblothing in einer Semidry-Western-Blot-Apparatur auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die Filterpapiere und die Nitrozellulosemembran wurden zuvor in Transferpuffer gelegt. Auf fünf Filterpapiere wurden die Nitrozellulosemembran und anschließend das Gel gelegt. Den Abschluss bildete eine Schicht aus fünf weiteren Filterpapieren. Der Transfer wurde für 90 min bei 250 V konstanter Spannung durchgeführt.

Inkubation mit Antikörper und Chemilumineszenz-Nachweisreaktion

Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Nitrozellulosemembran für 1 h in 5 % Magermilch in TBS-T-Puffer geschwenkt. Anschließend wurde die Membran für 1 h mit dem in TBS-T-Puffer verdünnten Primärantikörper inkubiert. Es folgten drei Waschschrte für je 10 min mit TBS-T und die Inkubation für 1 h mit einem Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörper. Der Nachweis der gebundenen Peroxidase unter Verwendung des Super Signal[®] West Pico Chemiluminescent Kits erfolgte nach fünf weiteren Waschschrten. Zur Detektion wurde auf die Membran ein Röntgenfilm (HyperfilmTM) aufgelegt.

3.2.2 Untersuchungen an primären Neuronenkulturen aus Rattenembryonen

3.2.2.1 Präparation des oberen Zervikalganglions aus Rattenembryonen

Die Präparation des oberen Zervikalganglions (*Ganglion cervicale craniale*) erfolgte nach dem Protokoll von Ch'ng et al. (2005). Die benötigten Instrumente und Materialien wurden vor jedem Gebrauch autoklaviert. Für die Zucht der Embryonen wurden weibliche Sprague-Dawley-Ratten angepaart und mittels Vaginalzytologie auf stattgefundene Bedeckung untersucht. Die Tiere wurden im positiven Fall voneinander getrennt. Am 15. Trächtigkeitstag wurden die weiblichen Tiere mit Isofluran[®] narkotisiert und anschließend mittels CO₂-Inhalation euthanasiert. Nach Eröffnung der Bauchdecke wurden die Embryonen unter sterilen Kautelen aus dem Uterus entnommen. Nach der Überführung der Embryonen in eine Glaspetrischale und zweimaligem Waschen in sterilem HBSS (Fisher Scientific) erfolgte unter einem Stereomikroskop die Präparation der oberen Zervikalganglien. Dazu wurde ein erster Schnitt zur Dekapitation der Embryonen und anschließend ein zweiter im Bereich des Unterkiefers durchgeführt. Die oberen Zervikalganglien liegen beidseits des Kehlkopfes und sind mit der *A. carotis interna* und dem *Ganglion distale n. vagi* benachbart. Vor der weiteren Behandlung der Ganglien wurden sie von anhaftendem Bindegewebe befreit.

3.2.2.2 Vorbehandlung der Zellkulturgefäße

Vor der Kultivierung der Zellen erfolgte eine Vorbehandlung der Zellkulturgefäße. Abhängig von den geplanten Untersuchungsmethoden wurden die Ganglien entweder auf Petrischalen (μ -Dish), auf Glas, Fluorpolymerfilmen oder im Drei-Kammer-Modell angezüchtet.

Alle Reagenzien wurden vor dem Gebrauch sterilfiltriert, sämtliche Arbeiten fanden unter sterilen Bedingungen statt.

Ungefähr 48 h vor dem Aussetzen der Neuronen wurden die Zellkulturgefäße für 24 h mit Poly-DL-Ornithin (500 µg/ml) bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte dreimaliges Waschen der Gefäße mit Wasser für Zellkulturzwecke (Fisher Scientific) und eine erneute Inkubation für 24 h bei 37 °C mit Laminin (10 µg/ml). Vor dem Aussetzen der Neuronen wurden die Gefäße erneut zweimal gewaschen.

3.2.2.3 Anzucht im Drei-Kammer-Modell

Für die Untersuchungen des intraaxonalen Transportes wurden die Neuronen im Drei-Kammer-Modell kultiviert (Ch'ng und Enquist 2005b; 2006). Dazu wurden Teflonringe nach CAMPENOT verwendet, die vor jedem Gebrauch autoklaviert wurden. Die verwendeten Petrischalen wurden ebenfalls mit Poly-DL-Ornithin und Laminin beschichtet. Kurz vor der Explantation der Ganglien, wurde jeweils ein Teflonring auf einer Petrischale befestigt. Dazu wurden nach dem Entfernen des Laminins die Petrischalen zweimal mit Wasser für Zellkulturzwecke gewaschen und anschließend luftgetrocknet. Auf dem Boden der Gefäße wurden parallele Rillen eingebracht und 40 µl 1 % Methozel darauf verteilt. Der Teflonring wurde nun mittels Silikon auf dem Boden befestigt, so dass die Rillen im Boden in allen drei Kammern verliefen. Die Kammer, in die später die Neuronen ausgesät wurden, wurde als S-Kammer (Soma) bezeichnet, die mittlere Kammer als M- und die dritte als N-Kammer (Neuriten).

Für die Anzucht der Neuronen im Drei-Kammer-Modell wurden die entnommenen Ganglien zunächst in HBSS-Puffer gesammelt. Es folgte eine Zentrifugation bei 4000 UpM für 1 min und das vorsichtige Entfernen des Überstandes. Anschließend wurde 1 ml Trypsin (500 µg/ml) zugefügt und bei 37 °C für 15 min inkubiert. Es folgte eine erneute Zentrifugation bei 4000 UpM für 1 min. Das Trypsin wurde entfernt und 1 ml Trypsin-Inhibitor (1 mg/ml) zugefügt und für weitere 5 min bei 37 °C inkubiert. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt bei 4000 UpM für 1 min wurde der Überstand vorsichtig entfernt und 1 ml Zellkulturmedium für Neuronen zugegeben. Mit einer abgerundeten Pasteurpipette wurden die Ganglien dissoziiert. Danach wurden 100 µl in die entsprechende Kammer (S-Kammer) gegeben und 200 µl Medium zugefügt. Die Kultivierung der Neuronen erfolgte ebenfalls in feuchter Atmosphäre bei 37 °C und 5 % CO₂. Neben dem Mediumwechsel erfolgte regelmäßig die Kontrolle des Axonwachstums. Nach einer Inkubationsdauer von 7-10 d hatte ein Großteil der Axone

die N-Kammer erreicht und die Zellen wurden für die weiteren Untersuchungen, wie unter Punkt 3.2.2.4 beschrieben, verwendet.

3.2.2.4 Konfokale Zeitrafferaufnahmen

Die Zeitrafferaufnahmen zur Untersuchung des intraaxonalen Transportes wurden an Neuronen durchgeführt, die im Drei-Kammer-Modell kultiviert wurden, und an Ganglienexplantaten. Im Drei-Kammer-Modell wurden nur Kulturen verwendet, deren Axone die N-Kammer erreicht hatten.

Für die Darstellung des retrograden Transportes wurden Ganglienexplantate mit ca. 1×10^7 PFU der verschiedenen Virusmutanten infiziert. Die Virussuspension wurde dazu in die Petrischale gegeben und die Kulturen sofort nach der Infektion genutzt.

Um die anterograden Transportprozesse darzustellen, wurde das Drei-Kammer-Modell verwendet. Die Infektion erfolgte in der S-Kammer mit ca. 1×10^4 PFU der Virusmutanten für 1 h bei 37 °C. Durch einen anschließenden Mediumwechsel wurde nichtgebundenes Virus entfernt und es folgte die weitere Inkubation in feuchter Atmosphäre bei 37 °C und 5 % CO₂ für 24 h.

Die Emission der fluoreszierenden Proteine, die mit dem Kapsid der Viruspartikel assoziiert waren, wurde bei 37 °C mit einem 63 x 1,4 Ölimmersionsobjektiv im konfokalen Laser-Scan-Mikroskop nach Anregung mit einem Argonlaser (488 nm) bzw. einem Helium-Neon-Laser (543 nm) aufgezeichnet.

3.2.2.5 Messung des intraaxonalen Transportes

Die aufgenommenen Videosequenzen wurden mit Hilfe der ImageJ Software (Abramoff et. al. 2004) ausgewertet.

3.2.2.6 Immunfluoreszenztechniken

Die Neuronen wurden in Petrischalen auf einem vorbehandelten Fluoropolymerfilm (Aclar) kultiviert. Die Zellen wurden mit 1 ml 4 % PFA für 10 min fixiert und anschließend dreimal mit PBS gewaschen. Danach folgte ein Blockierungsschritt mit 3 % BSA in PBS bei 4 °C über Nacht. Am nächsten Tag wurde die Blockierungslösung entfernt und die Neuronen mit 3 % BSA und 1 % Saponin in PBS für 10 min inkubiert. Nach Absaugen der Lösung wurde der primäre Antikörper zugegeben und für 1 h inkubiert. Anschließend wurden die Kulturen dreimal mit dem BSA/Saponin/PBS-Puffer gewaschen und der sekundäre Antikörper für 30 min zugegeben. Es folgten weitere Waschschrte mit dem BSA/Saponin/PBS-Puffer und das Eindecken mit

Fluoreszenzerhaltungspuffer (DABCO). Am konfokalen Mikroskop wurden die konjugierten Fluorophore entsprechend ihrer Wellenlänge angeregt und dargestellt.

3.2.2.7 Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden die Ganglien jeweils auf vorbehandelte Glasobjektträger in Petrischalen verteilt und 2 ml Neuronenmedium hinzugefügt. Die Ganglien wurden in feuchter Atmosphäre bei 37°C und 5 % CO₂ für 5-7 d bei regelmäßigem Mediumwechsel kultiviert.

Für die Infektion wurden die entsprechenden Virusmutanten (10⁵ PFU/ml) für eine Stunde auf den Ganglien belassen. Danach erfolgten ein Mediumwechsel und eine weitere Kultivierung bei 37 °C.

Nichtinfizierte und infizierte Ganglien wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Infektion mit 2,5% Glutardialdehyd gepuffert in 0,1 M Natriumcacodylat-Puffer (300 mosmol/l, pH 7,2) für 60 min fixiert. Im Anschluß an mehrere Waschschrte mit Puffer erfolgten eine Nachfixierung mit 1% Osmiumtetroxid sowie die Blockkontrastierung über Nacht mit Uranylazetat. Nach stufenweiser Entwässerung in Ethanol und Propylenoxid als Intermedium, erfolgte die Infiltration mit Epoxidharz (Glycidether 100) und die Polymerisation für 4 d bei 59 °C. Vor der Anfertigung von Ultradünnschnitten wurden die Gewebe von den Objektträgern durch Einfrieren in flüssigem Stickstoff mit nachfolgendem Tauchen in Wasser getrennt. Die Ultradünnschnitte wurden mit Uranylazetat und Bleisalzen nachkontrastiert. Die elektronenmikroskopische Auswertung wurde an einem Tecnai 12 Transmissionselektronenmikroskop vorgenommen.

Die elektronenmikroskopische Präparation und Untersuchungen wurden im Laboratorium für Elektronenmikroskopie des FLI, Insel Riems, von Herrn Dr. habil. H. Granzow und Frau P. Meyer durchgeführt.

3.2.2.8 In-vivo-Untersuchungen

3.2.2.9 Versuchstiere

Für die Infektionsversuche wurden 6-8 Wochen alte CD1-Mäuse, 8-9 Wochen alte Hausschweine und 8 Monate alte Wildschweine verwendet.

Zur Bestimmung der durchschnittlichen Überlebenszeit wurden für jede zu untersuchende PrV-Mutante 10 Mäuse und für den Wildtyp und die jeweilige Revertante jeweils 3 Mäuse inokuliert. Zur Untersuchung der Kinetik der

Neuroinvasion bei ausgewählten PrV-Mutanten wurden zur Analyse von neuronalen Zentren mittels Immunhistochemie alle 24 h p.i. zwei Mäuse euthanasiert.

Für die Infektionsversuche von Schweinen wurden 5 Haus- und 2 Wildschweine verwendet.

Die Tiere wurden zweimal am Tag über den jeweiligen Versuchszeitraum beobachtet und klinisch untersucht. Beim Auftreten von hochgradiger Symptomatik, wie Juckreiz mit Automutilation, dermalen Erosionen und hochgradiger Apathie, wurden die Tiere euthanasiert und anschließend Gewebeproben entnommen.

3.2.2.10 Intranasale Inokulation

Sowohl die Mäuse als auch die Haus- und Wildschweine wurden intranasal mit den zu untersuchenden Virusmutanten inokuliert.

Für die Infektionsversuche an den Mäusen wurden Virusmutanten basierend auf PrV-Kaplan verwendet. Die Infektion der Schweine wurde mit PrV-NIA3 durchgeführt.

Die Mäuse wurden zunächst mit einem Gemisch von Ketamin (60 mg/kg) und Xylazin (3 mg/kg) intraperitoneal anästhesiert. Während der nur kurz dauernden leichten Narkose erfolgte die Applikation von jeweils 5 µl Virussuspension (10^6 PFU/ml) in jedes Nasenloch im Abstand von 10 min.

Die Wildschweine wurden vor der Infektion mit 0,5 ml Zoletil 100[®] (Virbac) intramuskulär anästhesiert. Sowohl die Haus- als auch die Wildschweine erhielten 1 ml PrV-NIA3 (10^6 KID₅₀/ml) intranasal zur Infektion.

3.2.2.11 Intradermale Inokulation („Flankenmodell“)

Für die intradermale Inokulation wurden die Mäuse nach Anästhesie im Bereich der rechten Flanke rasiert. Anschließend erfolgte mittels einer Kanüle eine oberflächliche Skarifikation der Haut. Zur Bestimmung der mittleren Überlebenszeit wurden 12 Tiere mit 10 µl PrV-Ka (10^6 PFU/ml) intradermal infiziert. Zur Untersuchung der Kinetik der Neuroinvasion in Rückenmark und Gehirn wurden alle 24 h p.i. zwei Mäuse euthanasiert.

3.2.2.12 Organentnahme und Fixierung

Die infizierten Mäuse wurden zu den entsprechenden Zeitpunkten entnommen und euthanasiert. Für die Perfusionsfixierung wurden die Tiere mittels eines Ketamin-Xylazin-Gemisches (100 mg/kg Ketamin und 5 mg/kg Xylazin) anästhesiert und nach Ausfall des Zwischenzehenreflexes wurde der Brustkorb eröffnet und die linke

Herzkammer katheterisiert. Durch Eröffnung des rechten Vorhofes erfolgte die Entblutung, an die sich eine 3 min Perfusion mit PBS anschloss. Anschließend kam es durch eine 10 min Perfusion mit eiskaltem 4 % Paraformaldehyd (PFA) zur Fixierung. Zur Nachfixierung wurde der Kopf abgetrennt und komplett für mindestens weitere 48 h in 4 % PFA belassen. Anschließend erfolgte für die feingewebliche Weiterbearbeitung eine 24 h Entmineralisierung in Decal 2000®.

Die Euthanasie der Haus- und Wildschweine erfolgte durch Entbluten nach vorheriger Elektrobetäubung. Für die histopathologischen und immunhistologischen Untersuchungen wurden Nase, Gehirn, Trigeminalganglion, Tonsille, Lymphknoten und Lunge entnommen und in 4 % neutralgepuffertem Formalin fixiert.

3.2.3 Histopathologische Untersuchungen

3.2.3.1 Einbettung und Herstellung von Paraffinschnitten

Für die Anfertigung der Übersichtsfärbung, der immunhistologischen Färbungen sowie für die In-situ-Hybridisierung wurden die formalinfixierten Gewebe innerhalb von 24 h in einer aufsteigenden Alkoholreihe (Ethanol 50 %, 70 %, 80 %, 96 %, Isopropanol und Xylol) entwässert und anschließend in Paraffin eingebettet. Von den zu untersuchenden Geweben aus den Mäusen und Schweinen wurden Schnitte mit einer Dicke von ungefähr 3 µm hergestellt, im Streckbad bei 40 °C geglättet, auf SuperFrost® oder SuperFrost® Plus Objektträger aufgezogen und über Nacht bei 40 °C getrocknet.

3.2.3.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE)

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung als Übersichtsfärbung wurde nach dem folgenden Standardprotokoll durchgeführt.

1. Entparaffinieren der Schnitte in Xylol für 2 x 5 min und anschließend in Isopropanol für 2 x 3 min.
2. Rehydrieren über eine absteigende Alkoholreihe (96 %, 80 %, 70 %, 50 %) für jeweils 3 min.
3. Spülen in Aqua dest. für 3 min.
4. Färben in Hämalaun nach Mayer und anschließend Bläuen in fließendem Leitungswasser für jeweils 10 min.
5. Färben in Eosin/Phloxin für 2 min und kurzes Spülen in Aqua dest.
6. Kurzes Entwässern in 70 %, 80 %, 90 % Isopropanol.
7. Spülen in n-Propanol für 2 x 1 min und in Xylol für 2 x 5 min.

8. Eindecken der Gewebeschnitte mit Corbit-Balsam (Eukitt[®]).

3.2.3.3 ABC-Methode

Die Durchführung der ABC-Methode zum immunhistologischen Antigennachweis erfolgte in Anlehnung an das von Hsu et al. (1981) beschriebene Standardprotokoll. Die Inkubationsschritte erfolgten bei Raumtemperatur.

1. Entparaffinieren der Schnitte in Xylol für 2 x 5 min, anschließend Isopropanol für ebenfalls 2 x 5 min und für 2 x 3 min in 96 % Ethanol.
2. Inaktivierung der endogenen Peroxidasen für 10 min in 3 % Wasserstoffperoxid in Methanol.
3. Rehydrieren der Schnitte in einer absteigenden Ethanolreihe (80 %, 70 %, 50 %) für jeweils 3 min.
4. Spülen in Aqua dest. für 3 min.
5. Inkubation mit unverdünntem Ziegennormalserum zum Blockieren der unspezifischen Bindungsstellen in einer feuchten Kammer für 30 min.
6. Absaugen des Ziegenserums.
7. Auftragen des primären Antikörpers und Inkubation in feuchter Kammer für 1 h.
8. Waschen der Schnitte in TBS für 3 x 3 min.
9. Auftragen des biotinylierten sekundären Antikörpers und Inkubation für 30 min in einer feuchten Kammer.
10. Spülen in TBS für 3 x 3 min.
11. Auftragen und Inkubation mit dem ABC-Komplex in feuchter Kammer für 30 min. Die beiden Komponenten Avidin DH und biotinylierte Meerrettichperoxidase wurden gemäß den Herstellerangaben in TBS 30 min vor Gebrauch angesetzt.
12. Spülen der Schnitte in TBS 3 x 3 min.
13. Auftropfen der AEC-Lösung und Inkubation unter Sichtkontrolle bis zur Signalentwicklung.
14. Waschen der Schnitte in Aqua dest. für 5 min.
15. Färben mit Hämalaun nach Mayer für 2 min und anschließendes Bläuen in Leitungswasser für 10 min.
16. Eindecken mit Aquatex[®].

3.2.3.4 Nicht-radioaktive In-situ-Hybridisierung

Die Methode der nichtradioaktiven In-situ-Hybridisierung wurde zum Nachweis genomischer UL19-DNA-Sequenzen an Paraffinschnitten formalinfixierter Gewebe durchgeführt. Als interne Negativkontrollen dienten nicht infizierte Kerngebiete und zum Nachweis der Spezifität wurden Folgeschnitte mit Hybridisierungspuffer ohne Verwendung der Sonde inkubiert. Die Herstellung der DIG-markierten DNA-Sonde geschah unter Verwendung des unter Punkt 3.2.1.10 beschriebenen PCR-Protokolls mit den Primern UL19F und UL19R. Die Inkubation erfolgte, wenn nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur.

1. Entparaffinierung der Schritte erfolgte wie unter Punkt 3.2.3.2 beschrieben.
2. Anschließend proteolytischer Verdau unter Verwendung von Proteinase K (5 µg/ml) für 30 min bei 37 °C.
3. Durch zweimaliges Spülen der Schnitte in Aqua dest. wurde die Proteolyse beendet, danach folgte die Überführung in 96 % Ethanol für 5 min mit anschließender Lufttrocknung.
4. Für die DIG-DNA-Sonde wurden zunächst 2,5 µl Heringssperma-DNA (10 mg/ml) mit 1,0 µl der DNA-Sonde (ca. 25 ng/µl) und 3,5 µl Formamid bei 96 °C für 5 min denaturiert und anschließend auf Eis gekühlt. Der Sondenmix wurde mit 21,5 µl Formamid, 10,0 µl 20x SSC, 1,0 µl Denhardts Lösung, 5,0 µl 50 % Dextransulfat und 5,5 µl Aqua dest. versetzt. Pro Gewebsschnitt wurden 50 µl der Hybridisierungslösung aufpipettiert.
5. Zur Denaturierung zellulärer DNA wurden die Objektträger mit dem aufgetragenen Hybridisierungspuffer in einer Metallschale im Wasserbad für 5 min bei 95 °C erhitzt und anschließend auf Eis abgekühlt.
6. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 40 °C in einer feuchten Kammer.
7. Die Entfernung ungebundener und unspezifisch hybridisierter Sonde geschah durch zwei Stringenzwaschungen (zuerst 2 x SSC, danach 0,1 x SSC) zu je 10 min.
8. Zum immunologischen Nachweis der Hybride erfolgte zunächst eine Inkubation in Äquilibrierungspuffer (5 % normales Schafserum (NSS) und 0,3 % Triton X 100 in Puffer I) für 30 min. Im Folgenden wurde Schaf-Anti-Digoxigenin-Alkalische-Phosphatase-Konjugat in einer Verdünnung von 1:500 auf die Schnitte aufgetragen und für 1 h inkubiert.

9. Es folgte ein zweimaliges Spülen der Objektträger für jeweils 15 min in Puffer I und eine anschließende Äquilibrierung mit Puffer III. Hierauf folgte die Farbreaktion. Dafür wurden 4,5 µl Nitro Blue Tetrazolium (NBT), 3,5 µl X-Phosphat und 2,5 µl Levamisol (96 mg/ml) mit 1000 µl Puffer III vermischt und auf die Schnitte aufgetragen. Die Farbentwicklung wurde mikroskopisch kontrolliert und durch Einstellen der Schnitte in Aqua dest. gestoppt. Es erfolgte eine Gegenfärbung für 30 s mit Hämalun nach Mayer, die Bläuung in Leitungswasser und das Eindecken mit Aquatex[®].

4 Ergebnisse

4.1 In-vivo-Untersuchungen

4.1.1 Verlauf der AK in Schweinen nach experimenteller Infektion

Die intranasale Inokulation von PrV-NIA3 (10^6 KID₅₀/ml) in fünf Haus- und zwei Wildschweinen führte ab dem 2. Tag pi zu verminderter Futteraufnahme, Ataxie, Bewegungsstörungen und Erhöhung der Körpertemperatur. Lediglich ein Haus- und ein Wildschwein zeigten intensives Kratzen (Juckreiz) im Bereich der Nase. Zwischen dem 3. und 5. Tag p.i. kam es nach progressiver Störung des Allgemeinbefindens zum Verenden der Tiere.

Die pathomorphologische Untersuchung ergab eine follikuläre Hyperplasie der Milz sowie eine Schwellung der *Lnn. mandibulares, inguinales* und *mesenteriales*. In der Nasenhöhle fand sich eine Hyperämie der Nasenmuschelschleimhaut mit gelblich-grauer, schleimiger Exsudation. Neben einem akuten Lungenödem waren bei drei Tieren im Bereich der Haupt- und Spitzenlappen der Lunge verdichtete dunkelrote Bereiche zu beobachten. Nur zwei Tiere wiesen Hauterosionen an der Rüsselscheibe sowie an den Gliedmaßen auf.

Histopathologisch fanden sich eine mittelgradige gemischtzellige Rhinitis mit Hämorrhagien und ausgedehnter Nekrose des Nasenepithels sowie in einzelnen Bereichen auch der darunterliegenden Schichten (Abb. 4A). In der Tonsille von zwei Tieren waren Nekrosen des Kryptepithels sowie geringgradige gemischtzellige Infiltrate nachzuweisen (Abb. 4C). Die Untersuchung der Lunge ergab sowohl alveolär als auch interstitiell Infiltrate von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten. In einzelnen Bereichen war das Bronchialepithel hyperplastisch, es lagen herdförmige Bronchialepithelnekrosen vor. Im gesamten Lungenparenchym fand sich eine Proliferation der Pneumozyten Typ II.

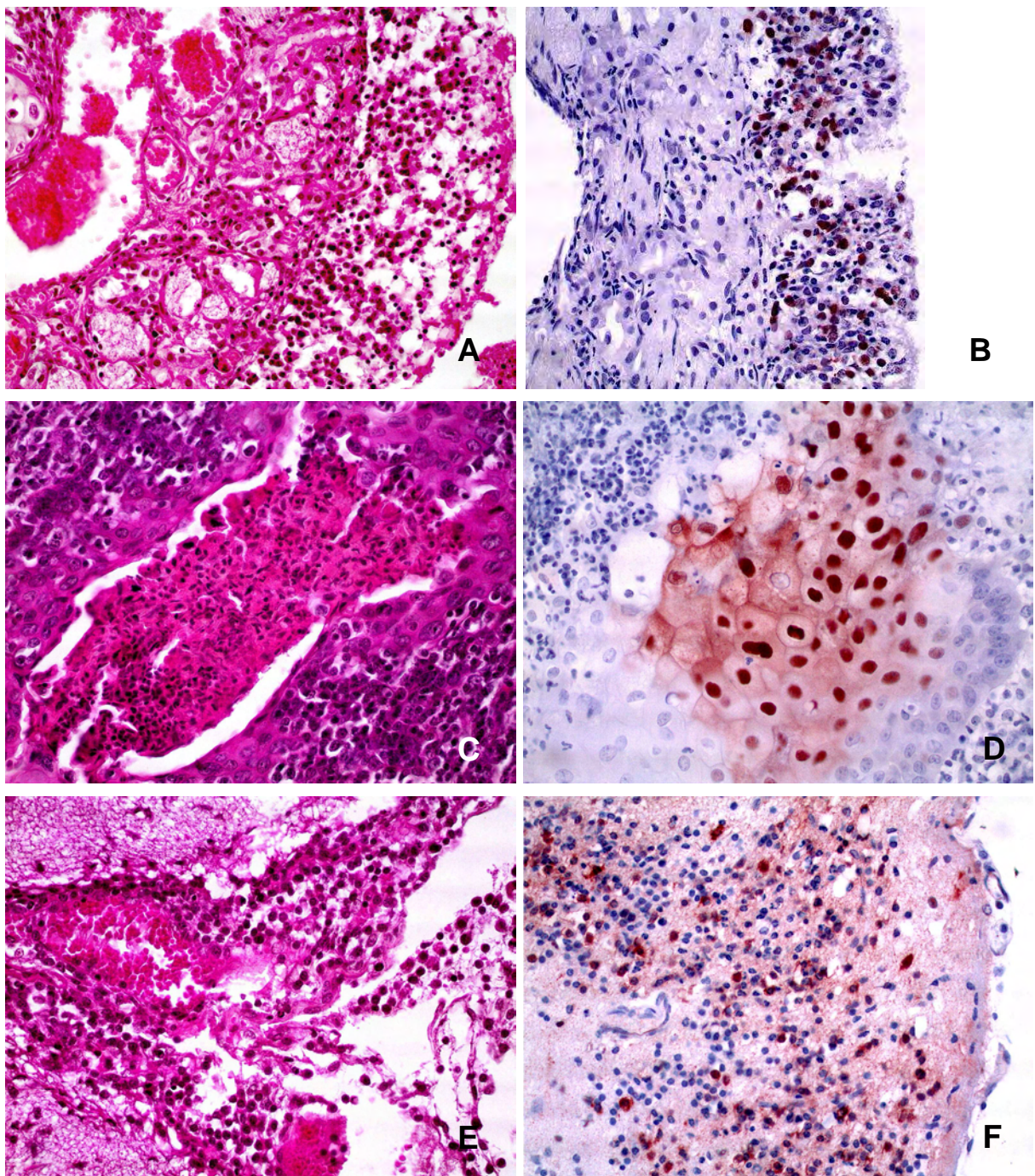


Abb. 4: **Histopathologische Veränderungen und immunhistologischer Nachweis von PrV-Antigen.** In Nase (A) und Tonsille (C) fanden sich Epithelnekrosen mit gemischtzelligen Infiltraten, im Großhirn traten submeningeale Infiltrate auf (E; HE-Färbung). UL19-Antigen (rotbraune Färbung) fand sich im Nasen- (B) und Tonsillenepithel (D), sowie in Neuronen und Gliazellen des ZNS (F), Vergrößerung A-F x 400.

Der immunhistologische Nachweis des Hauptkapsidproteins pUL19 gelang läsionsassoziiert im respiratorischen Epithel sowie in Zellen der Submukosa der Nase

sowie bei einem Tier in Epithelzellen der Tonsille (Abb. 4B, D). Durch In-situ-Hybridisierung konnte UL19-DNA im Nasenepithel und in der Submukosa nachgewiesen werden.

Im Großhirn fanden sich histopathologisch ausgedehnte perivaskuläre und submeningeale Infiltrate (Abb. 4E). Es dominierten Ansammlungen von Lymphozyten, Makrophagen und neutrophilen Granulozyten. Herdförmige Ansammlungen von Makrophagen und Neutrophilen in der grauen Substanz konnten bei einem Schwein nachgewiesen werden. Im Großhirn zeigten einzelne Neuronen Degenerationserscheinungen in Form von Hypereosinophilie und Kernwandhyperchromasie. In der Nachbarschaft einzelner Neuronen fanden sich Lymphozyten und Gliazellen (Neuronophagie). Nur im Kern weniger Neuronen lagen eosinophile intranukleäre Einschlusskörperchen vom Typ Cowdry A vor. Im Kleinhirn fanden sich ebenfalls perivaskuläre gemischtzellige Infiltrate, jedoch waren diese in ihrer Ausprägung deutlich geringer als im Großhirn. Sowohl im Groß- als auch im Kleinhirn fanden sich in beiden Anteilen des Parenchyms Proliferationen von Gliazellen, die stellenweise in dichten Herden (Gliaknötchen) vorzufinden war.

Der Nachweis von UL19-Antigen war nur in einzelnen Neuronen und Gliazellen im ZNS möglich (Abb. 4F). Mittels In-situ-Hybridisierung ließ sich im Großhirn PrV-DNA nachweisen (Abb. 5A).

Im Rückenmark konnten histologisch mononukleäre perivaskuläre und submeningeale Infiltrate, herdförmige Ansammlungen von Makrophagen in der grauen und weißen Substanz und Gliazellproliferationen beobachtet werden. Sowohl bei einem Haus- als auch bei einem Wildschwein kam es zu einer Ganglioneuritis des Trigemininalganglions. Während bei dem Hausschwein neben Makrophagen auch zahlreiche neutrophile Granulozyten zu finden waren, dominierten bei dem Wildschwein mononukleäre Zellen.

Für die Real-time PCR wurden Proben von allen Schweinen aus der Tonsille (Abb. 5B), dem Trigemininalganglion und dem Großhirn untersucht. Für die Auswertung wurde der Schwellenwert für die Fluoreszenz auf 1000,00 dR gelegt. Dabei lag der Schwellenwert-Zyklus (Ct-Wert) bei allen untersuchten Proben zwischen 14-30 Zyklen.

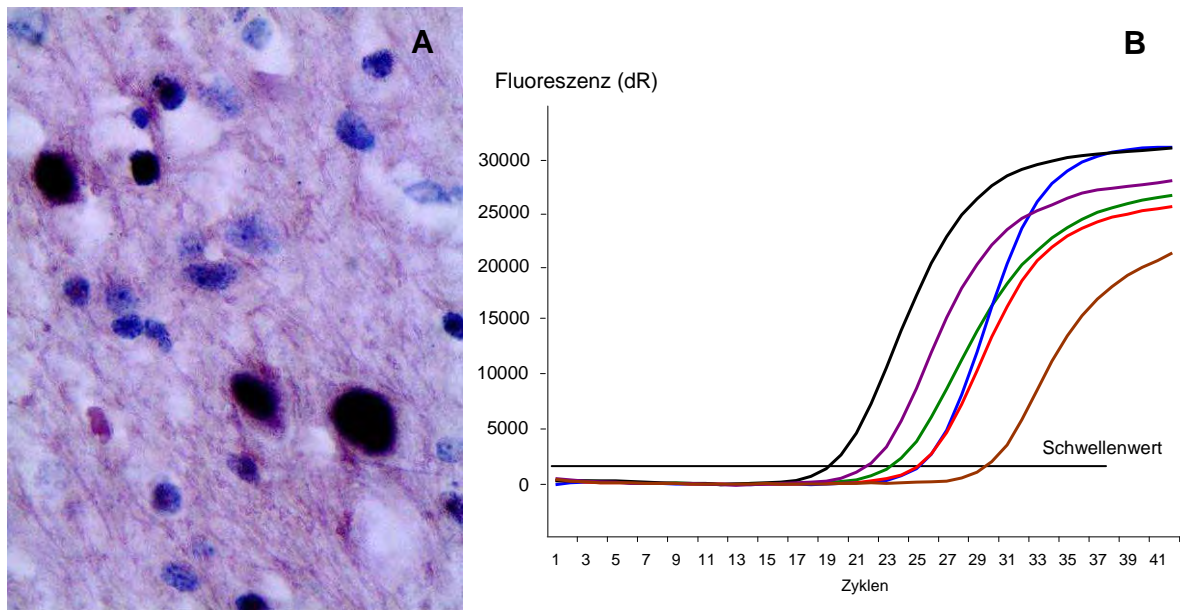


Abb. 5: **Nachweis von PrV-DNA.** In Neuronen und Gliazellen im Großhirn konnte mittels In-situ-Hybridisierung PrV-DNA (schwarze Färbung) dargestellt werden (A, x 1000). Bei allen Tieren gelang der Nachweis von PrV-spezifischer DNA aus Tonsillengewebe mittels Real-time PCR (B).

4.1.2 Bestimmung der mittleren Überlebenszeit in Mäusen nach PrV-Infektion

Die mittlere Überlebenszeit nach Infektion mit PrV-Wildtyp und einzelnen PrV-Mutanten wurde an jeweils zehn sechs bis acht Wochen alten CD1-Mäusen bestimmt. Die intranasale Inokulation erfolgte mit jeweils 10 μ l Virussuspension (10^6 PFU/ml) der einzelnen Virusmutanten.

In Abb. 6 sind die ermittelten Überlebenszeiten der einzelnen Virusmutanten dargestellt.

Eine Reihe von Virusmutanten zeigte einen dem Wildtyp PrV-Kaplan (PrV-Ka) ähnlichen Phänotyp. Dabei lagen die beobachteten Überlebenszeiten nach intranasaler Infektion zwischen 50 h p.i. (PrV-Ka) und 56 h p.i. (PrV-NIA3). Ab 24 h p.i. konnten Apathie mit gekauerter und aufgekrümmter Haltung sowie Anorexie beobachtet werden. Im weiteren Verlauf der Infektion verschlimmerten sich die klinischen Anzeichen. Etwa 40 h p.i. zeigten die Tiere zudem anfallsartiges Kratzen im Bereich des Kopfes (Juckreiz) oder der Schulter. Es kam zu Automutilationen mit großflächigen Blutungen. Neben der zunehmenden Apathie konnten auch Phasen von Hyperaktivität mit anfallsartigen Exzitationen und Konvulsionen sowie schwere Dyspnoe beobachtet werden. Im moribunden Stadium wurden die Mäuse euthanasiert.

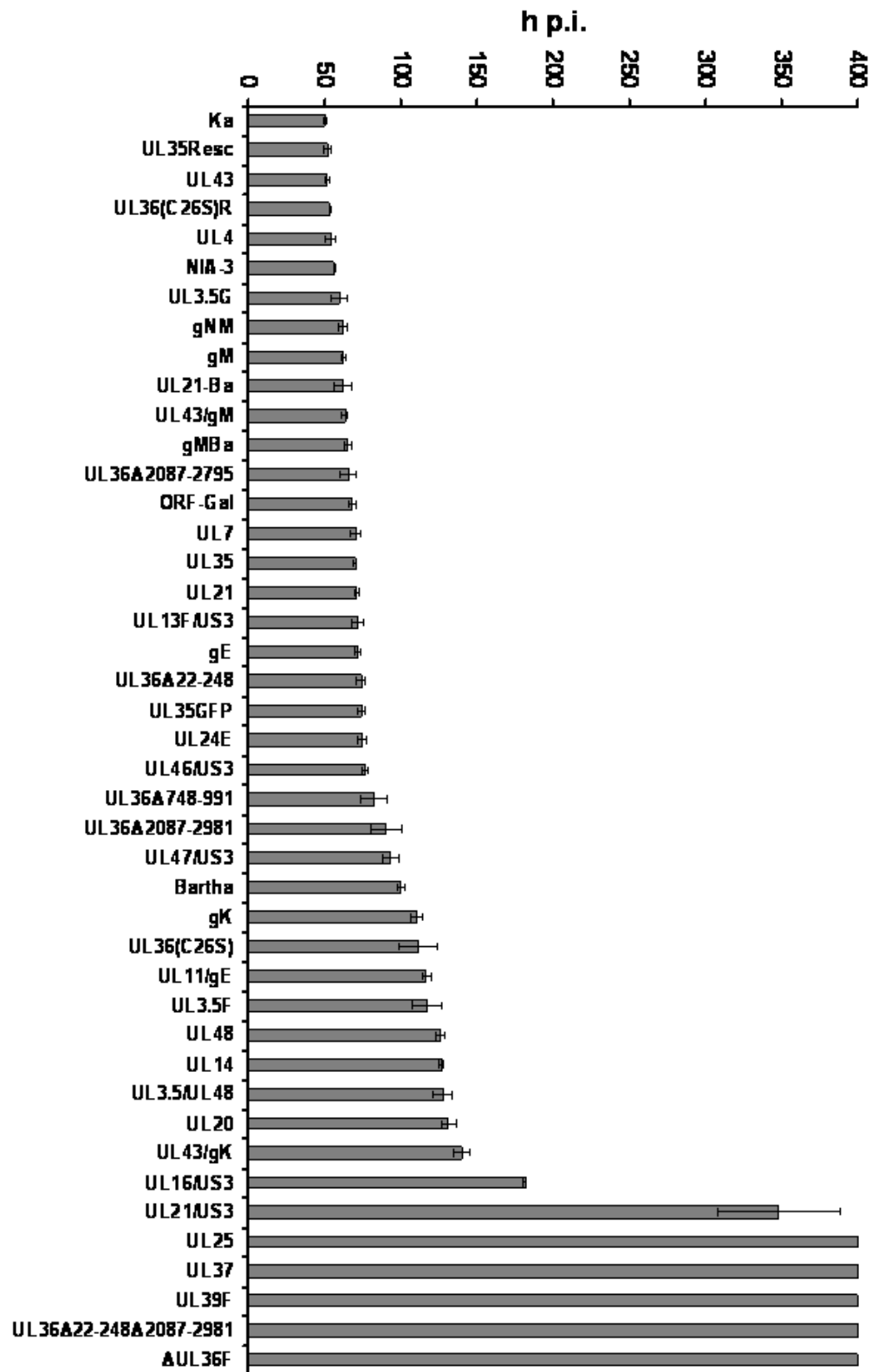


Abb. 6: **Durchschnittliche Überlebenszeiten von CD1-Mäusen nach intranasaler Infektion.**
 Intranasale Inokulation von jeweils 10^4 PFU, maximaler Untersuchungszeitraum 400 h
 p.i., n = 10 Mäuse.

Es fanden sich Virusmutanten, die nach intranasaler Inokulation eine geringe Attenuierung gegenüber dem Wildtyp aufweisen. Die Überlebenszeiten lagen hierbei zwischen 60 h p.i. (PrV-ΔUL3.5G) und 93 h p.i. (PrV-ΔUL47/US3). Das klinische Bild ähnelte dem einer Wildtypvirusinfektion, jedoch traten die ersten Symptome mit einer Verzögerung von 12-16 h auf. Im weiteren zeitlichen Verlauf waren sie jedoch mit PrV-Ka vergleichbar.

Eine deutliche Reduktion der Virulenz zeigten Virusmutanten mit mittleren Überlebenszeiten zwischen 100 h p.i. (PrV-Bartha) und 348 h p.i. (PrV-ΔUL21/US3). Die ersten klinischen Anzeichen begannen bei den meisten Mäusen 72 h p.i. und verschlimmerten sich im weiteren Verlauf. Ein abweichendes klinisches Bild ergab sich nur nach Infektion mit PrV-ΔUL21/US3.

Bei einigen PrV-Mutanten führte die Deletion einzelner Gene zum Verlust der Neurovirulenz. Die Mäuse zeigten bis zum Ende des Untersuchungszeitraumes keine klinischen Erscheinungen.

4.1.3 Intradermale Inokulation von PrV-Kaplan

Die intradermale Inokulation von PrV-Kaplan (PrV-Ka) wurde an 12 Tieren mit 10 µl Virussuspension (10^6 PFU/ml) im Bereich der rechten Flanke durchgeführt.

In Abb. 7 ist die mittlere Überlebenszeit nach intranasaler und intradermaler Inokulation im Vergleich dargestellt. Dabei wiesen in die Haut infizierte Mäuse, eine um 40 h verlängerte Überlebenszeit auf.

Die intradermale Inokulation führte 72 h p.i. zu ersten klinischen Anzeichen. Die Mäuse zeigten Apathie und geringgradiges Kratzen im Bereich der rechten Flanke. Im weiteren Verlauf wiesen die Tiere ausgedehnte Exkorationen im Flankenbereich auf. Mäuse wurden bei Auftreten von hochgradigem Juckreiz euthanasiert.

Ab 24 h p.i. konnten immunhistologisch im *Stratum spinosum* infizierte Keratinozyten (Abb. 8A) sowie im Stratum papillare infizierte Talgdrüsenepithelzellen nachgewiesen werden. Histologisch fanden sich epidermale Hyperplasie, Hyperkeratose sowie herdförmige epidermale Nekrosen mit hochgradigen gemischtzelligen dermalen Infiltrationen aus neutrophilen Granulozyten, Lymphozyten und Makrophagen.

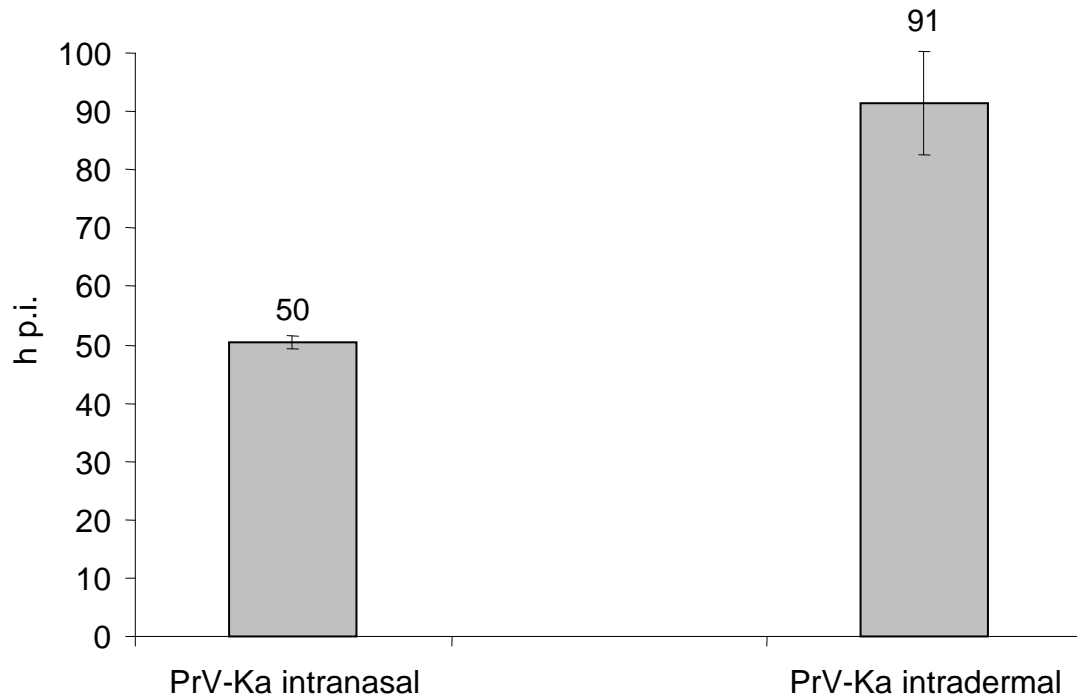


Abb. 7: **Mittlere Überlebenszeit von CD1-Mäusen nach experimenteller Infektion mit PrV.**
Intranasale bzw. intradermale Inokulation mit PrV-Ka, n = 12 Tiere.

Der Nachweis von UL19-Antigen im zentralen Nervensystem gelang erstmals 72 h p.i. Zu diesem Zeitpunkt wiesen in lumbalen und thorakalen Rückenmarksabschnitten einzelne Neuronen im Dorsalhorn der grauen Substanz und in der Pars intermedia in Nachbarschaft zum Zentralkanal Virusantigen auf (Abb. 8B, C). Desweiteren konnten einzelne infizierte Gliazellen in der weißen Substanz nachgewiesen werden. Ebenfalls zu diesem Zeitpunkt ließen sich infizierte Neuronen im ipsilateralen *Ganglion spinale* sowie im *Truncus sympathicus* darstellen. Histologisch zeigten einzelne Neuronen eine Kernwandhyperchromasie, in den Ganglien konnte eine vermehrte Proliferation von Gliazellen beobachtet werden. Ab 90 h p.i. und bis zum Zeitpunkt des Todes konnte UL19-Antigen in Neuronen sowohl im Dorsal- als auch im Ventralhorn des Rückenmarks nachgewiesen werden. Einzelne infizierte Neuronen fanden sich zu diesem Zeitpunkt auch im somatosensorischen Cortex (Abb. 8D; Bregma -1,70). Histopathologisch wies das Großhirn geringgradige perivaskuläre monozytäre Infiltrate sowie Gliazellproliferationen auf.

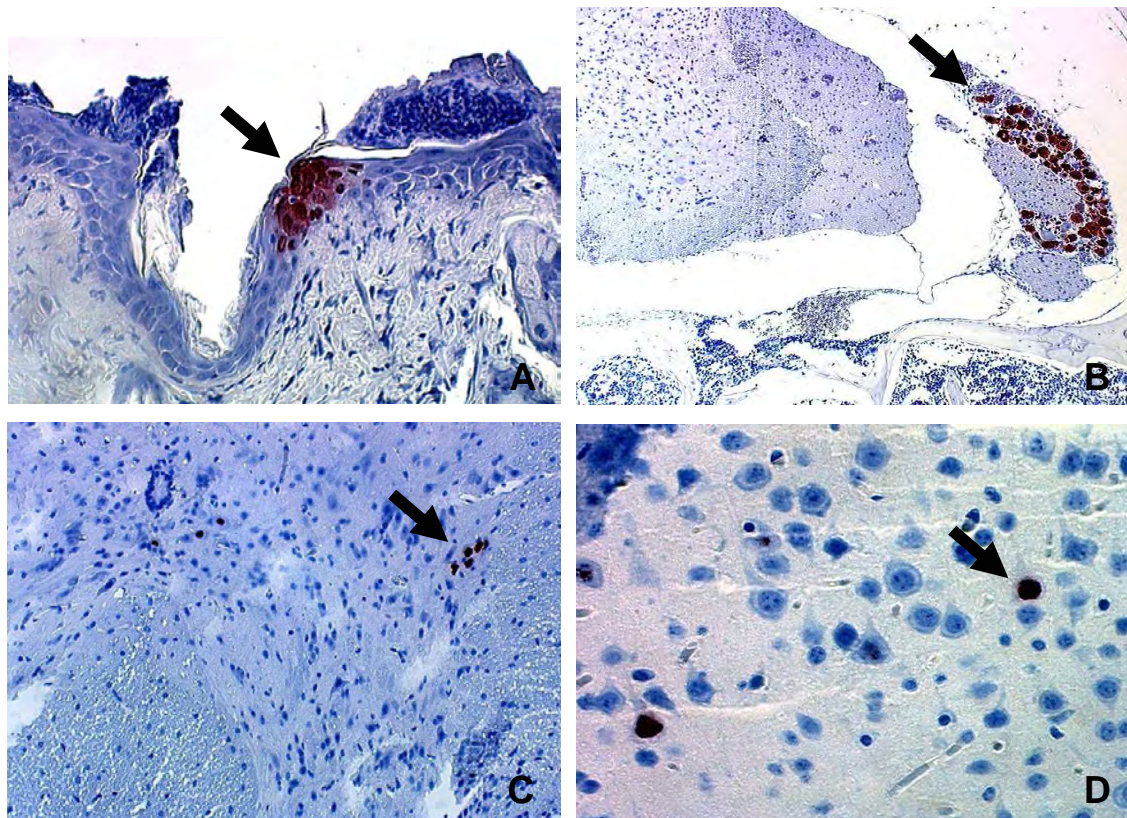


Abb. 8: **Immunhistologischer Nachweis von UL19-Antigen (rotbraune Färbung) nach intradermaler Inokulation.** 24 h p.i. finden sich antigenpositive Keratinozyten (A, x 200). 72 h p.i. sind Neuronen und Gliazellen im Spinalganglion (B, x 200) sowie im Rückenmark (C, x 400) infiziert. Der Nachweis infizierter kortikaler Neuronen im ZNS gelang nach 90 h p.i. (D, x 400).

4.1.4 Intranasale Inokulation von PrV-Kaplan

Die intranasale Inokulation mit 10 µl PrV-Ka (10^6 PFU/ml) ergab eine mittlere Überlebenszeit von 50 h p.i. (Abb. 7). Die ersten klinischen Anzeichen traten ab 24 h p.i. in Form von leicht gekrümmter Körperhaltung mit beginnender Apathie auf. Die Tiere zeigten 48 h p.i. hochgradigen Juckreiz im Kopfbereich, eine zunehmende Abgeschlagenheit, die von Stadien der Hyperaktivität unterbrochen wurde, sowie eine Tachypnoe. Bedingt durch den Juckreiz kam es zu Automutilationen mit Blutungen im Bereich der Nase sowie zu einem Ödem des Nasenrückens.

Der immunhistologische Nachweis von UL19-Antigen in der respiratorischen Nasenschleimhaut war bereits 24 h p.i. möglich (Abb. 11). Histologisch waren die infizierten Zellen degeneriert oder nekrotisch. Im Trigemininalganglion (TG) waren ebenfalls zu diesem Zeitpunkt antigenpositive Neuronen nachweisbar (Abb. 11). Die Infektion von Neuronen zweiter Ordnung im *Nucleus tractus spinalis n. trigemini* (Sp5) erfolgte 48 h p.i. Bei der histopathologischen Untersuchung konnten im TG und in den Kerngebieten des *N. trigeminus* nur vereinzelte Neuronendegenerationen festgestellt werden. Es fand sich keine entzündliche Reaktion in den genannten Bereichen.

4.1.5 In-vivo-Charakterisierung von PrV- Δ UL3.5-Mutanten

4.1.5.1 Intranasale Inokulation in Mäusen von PrV- Δ UL3.5F

Die intranasale Inokulation mit PrV- Δ UL3.5F (10^6 PFU/ml) führte zu einer mittleren Überlebenszeit von 117 h p.i. (Abb. 9). Erste klinische Anzeichen in Form von Apathie und geringgradigem Juckreiz im Kopfbereich begannen 72 h p.i. Die Symptome verstärkten sich drastisch 96 h p.i., die Tiere zeigten hochgradigen anfallsartigen Juckreiz, der zu ausgedehnten Exkoriationen und Blutungen im Kopfbereich führte.

Der immunhistologische Nachweis des Hauptkapsidproteins ergab 24 h p.i. einzelne infizierte respiratorische Epithelzellen in der Nase. Die Nasenepithelzellen zeigten histologisch eine geringgradige Hyperplasie sowie subepithelial eine Infiltration mit mononukleären Zellen.

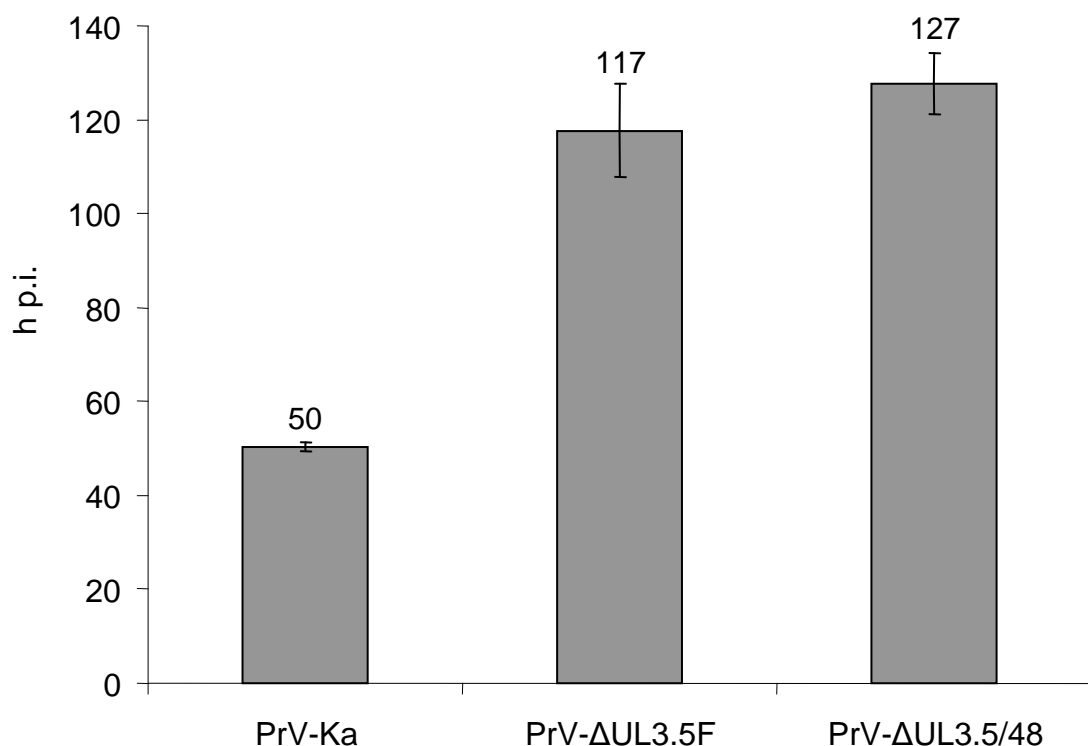


Abb. 9: **Intranasale Inokulation von CD1-Mäusen mit PrV-Ka, PrV- Δ UL3.5 und PrV- Δ UL3.5/48.**

Vergleichende Darstellung der mittleren Überlebenszeit, n = 10 Tiere.

Im Trigeminalganglion waren infizierte Neuronen erstmals 72 h p.i. nachweisbar. Die Infektion von Neuronen zweiter Ordnung wurde 96 h p.i. festgestellt, eine Infektion von kortikalen Neuronen fand dagegen in den untersuchten Mäusen nicht statt (Tab. 2). Ab 72 h p.i. konnten histologisch vereinzelt hypereosinophile, degenerierte Neuronen

nachgewiesen werden, Entzündungsvorgänge waren in den untersuchten Gehirnen nicht zu finden.

4.1.5.2 Intranasale Inokulation in Mäusen von PrV-ΔUL3.5/48

Die intranasal mit PrV-ΔUL3.5/48 (10^6 PFU/ml) infizierten Tiere zeigten eine mittlere Überlebenszeit von 127 h p.i. (Abb. 9). Die klinischen Erscheinungen begannen 96 h p.i. mit geringgradiger Apathie. Im weiteren Verlauf war das Ausmaß der Symptome vergleichbar mit solchen nach Infektion mit PrV-ΔUL3.5F.

Tab. 2: **Intranasale Infektion mit PrV-Ka, PrV-ΔUL3.5F und PrV-ΔUL3.5/48.**

Vergleichende Darstellung von mittlerer Überlebenszeit, Symptomen und Antigennachweis.

Standardabweichungen der Überlebenszeit finden sich in Klammern, n = 10.

Symptome: - = keine, + = geringgradig, +++ = hochgradig, † = tot.

Immunhistologie: - = nicht nachgewiesen.

Virus	PrV-Ka	PrV-ΔUL3.5F	PrV-ΔUL3.5/48
<u>Mittlere Überlebenszeit in h</u>	50 (± 1,08)	117 (± 9,9)	127 (± 6,4)
<u>Symptome</u>			
1 d p.i.	-	-	-
2 d p.i.	+++	-	-
3 d p.i.	†	+	-
4 d p.i.		+++	+
5 d p.i.		†	+++
6 d p.i.			†
<u>Immunhistologie</u>			
Nasenhöhle	1 d p.i.	1 d p.i.	1 d p.i.
Neuronen 1. Ordnung	1 d p.i.	3 d p.i.	4 d p.i.
Neuronen 2. Ordnung	2 d p.i.	4 d p.i.	4 d p.i.
Kortikale Neuronen	-	-	-

UL19-Antigen konnte 24 h p.i. im Epithel des Nasenrachenraumes nachgewiesen werden. Zu einer Infektion von Neuronen erster Ordnung kam es erst 96 h p.i. Zu diesem Zeitpunkt hatte bereits ebenfalls eine Ausbreitung des PrV in Neuronen zweiter Ordnung stattgefunden. Auch bei der Infektion mit PrV-ΔUL3.5/48 konnten keine infizierten kortikalen Neuronen gefunden werden (Tab. 2). In Nase, Nasenrachenraum und ZNS waren bei der histopathologischen Untersuchung keine entzündlichen

Infiltrate nachweisbar. Neuronen im Trigeminalganglion zeigten vereinzelt Degenerationserscheinungen.

4.1.6 In-vivo-Charakterisierung von UL35-Mutanten

4.1.6.1 Intranasale Inokulation von PrV- Δ UL35

Mit PrV- Δ UL35 (10^6 PFU/ml) infizierte Mäuse überlebten die intranasale Inokulation im Mittel 70 h (Abb. 10). Die ersten klinischen Erscheinungen in Form von Apathie, Anorexie, Dyspnoe und Kratzen im Kopfbereich traten erstmals 48 h p.i. auf. Der weitere klinische Verlauf war wie bei PrV-Ka infizierten Mäusen.

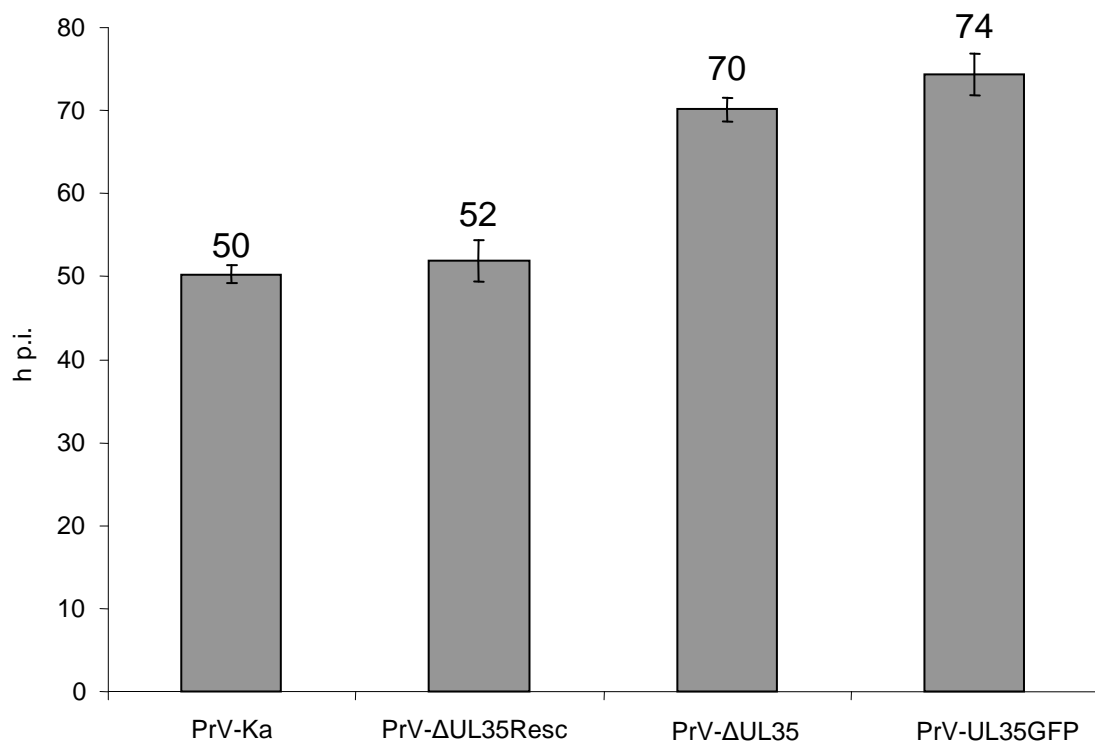


Abb. 10: **Mittlere Überlebenszeiten nach Infektionen von Mäusen mit PrV-Ka, PrV- Δ UL35Resc, PrV- Δ UL35 und PrV-UL35GFP.** n = 10 Tiere.

Der immunhistologische Nachweis von PrV-Antigen gelang im respiratorischen Nasenepithel erstmals 24 h p.i. und in Neuronen erster und zweiter Ordnung 48 h p.i. Kurz vor dem Todeszeitpunkt konnten auch vereinzelte infizierte kortikale Neuronen gefunden werden (Tab. 3). Histologisch fanden sich in der Nase gemischtzellige Infiltrate mit Nekrose des respiratorischen Epithels. Vereinzelt zeigten Neuronen erster und zweiter Ordnung Kernwandhyperchromasie und Hypereosinophilie.

4.1.6.2 Intranasale Inokulation von PrV-UL35GFP

Der klinische Verlauf sowie die Überlebenszeit nach Infektion mit PrV-UL35GFP (10^6 PFU/ml) und mit PrV- Δ UL35 waren vergleichbar (Abb. 10). Immunhistologisch ließ sich UL19-Antigen 24 h p.i. in der Nase nachweisen. Histologisch fanden sich in der Submukosa der Nase geringgradige lymphohistiozytäre Infiltrate. Ebenso gelang der Nachweis von infizierten Neuronen im TG 48 h p.i. Neuronen zweiter Ordnung waren erst 74 h p.i. infiziert (Tab. 3), im Großhirn fanden sich vereinzelt Gliazellproliferationen.

4.1.6.3 Intranasale Inokulation von PrV- Δ UL35Resc

Durch die Reinsertion von Wildtyp-UL35 wurde der Phänotyp bei den infizierten Mäusen hinsichtlich Überlebenszeit (Abb. 10), Symptomen und Antigenausbreitung (Tab. 3) mit PrV-Ka vergleichbar.

Tab. 3: Intranasale Infektion von Mäusen mit PrV-Ka, PrV-UL35Resc, PrV- Δ UL35 und PrV-UL35GFP.

Vergleichende Darstellung von mittlerer Überlebenszeit, Symptomen und Antigennachweis.

Standardabweichungen der Überlebenszeit finden sich in Klammern, n = 10 Tiere.

Symptome: - = keine, + = geringgradig, ++ = mittelgradig, +++ = hochgradig, † = tot.

Immunhistologie: - = nicht nachgewiesen.

Virus	PrV-Ka	PrV-ΔUL35Resc	PrV-ΔUL35	PrV-UL35GFP
<u>Mittlere Überlebenszeit in h</u>	50 (\pm 1,08)	52 (\pm 2,8)	70 (\pm 1,53)	72 (\pm 0,76)
<u>Symptome</u>				
1 d p.i.	-	-	-	-
2 d p.i.	+++	+++	++	+
3 d p.i.	†	†	+++	+++
4 d p.i.			†	†
<u>Immunhistologie</u>				
Nasenhöhle	1 d p.i.	1 d p.i.	1 d p.i.	1 d p.i.
Neuronen 1. Ordnung	1 d p.i.	1 d p.i.	2 d p.i.	2 d p.i.
Neuronen 2. Ordnung	2 d p.i.	2 d p.i.	2 d p.i.	3 d p.i.
Kortikale Neuronen	-	-	3 d p.i.	-

4.1.7 In-vivo-Charakterisierung von UL36-Mutanten

4.1.7.1 Intranasale Inokulation von PrV-ΔUL36F

Die Inokulation von PrV-ΔUL36F (10^6 PFU/ml) in CD1-Mäusen führte während des gesamten Beobachtungszeitraumes zu keinen Symptomen sowie zum Überleben der Tiere (Abb. 12). Immunhistologisch ließ sich zu keinem Zeitpunkt Virusantigen nachweisen.

4.1.7.2 Intranasale Inokulation von PrV-UL36Δ2087-2795

Mit PrV-UL36Δ2087-2795 (10^6 PFU/ml) infizierte Mäuse zeigten eine mittlere Überlebenszeit von 65 h p.i. (Abb. 12). Der klinische Verlauf war vergleichbar mit PrV-ΔUL35. Immunhistologisch ließ sich UL19-Antigen nach 24 h p.i. im Epithel der *Pars nasalis pharyngis* sowie bereits vereinzelt in Neuronen des TG nachweisen. Neben einer Zunahme infizierter Neurone erster Ordnung 48 h p.i., konnten zu diesem Zeitpunkt auch infizierte Gliazellen im Sp5C (Bregma -8,24 mm) sowie infizierte Neuronen im *Ganglion pterygopalatinum* und im *Ganglion oticum* gefunden werden. In den Ganglien waren einzelne hypereosinophile Neuronen mit Kernwandhyperchromasie vorhanden. Zu einer Infektion kortikaler Neuronen (Bregma -2,06) kam es kurz vor dem Todeszeitpunkt der Mäuse. Histologisch fanden sich im Gehirn Gliazellproliferationen, dagegen waren Einschlusskörperchen oder entzündliche Infiltrate nicht zu finden.

4.1.7.3 Intranasale Inokulation von PrV-UL36Δ22-248

In Abb. 12 ist die mittlere Überlebensdauer nach Infektion mit PrV-UL36Δ22-248 (10^6 PFU/ml) dargestellt. Die klinischen Erscheinungen begannen ab 48 h p.i. mit Apathie und nahmen dann den bereits bei PrV-Ka beobachteten Verlauf. Immunhistologisch fand sich nach 24 h p.i. UL19-Antigen in Zellen des respiratorischen Nasenepithels. Die infizierten Zellen zeigten Degenerationerscheinungen in Form von Kernwandhyperchromasie ebenso fand sich subepithelial eine Infiltration mit mononukleären Zellen. Der immunhistologische Nachweis infizierter Neuronen erster Ordnung im TG sowie zweiter Ordnung im Sp5C (Bregma -7,56) gelang 48 h p.i. Zum Todeszeitpunkt war es ebenfalls möglich, infizierte Neuronen im Kortex (Bregma -2,54) nachzuweisen. Im Parenchym des Großhirns fanden sich herdförmige und diffuse Proliferationen von Gliazellen und einzelne Neuronen mit Degenerationerscheinungen.

4.1.7.4 Intranasale Inokulation von PrV-UL36Δ748-991 und PrV-UL36Δ2087-2981

Mit PrV-UL36Δ748-991 (10^6 PFU/ml) infizierte Mäuse überlebten im Mittel 82 h p.i., wohingegen eine Infektion mit PrV-UL36Δ2087-2981 (10^6 PFU/ml) erst nach 90 h zum Tod führte (Abb. 12).

4.1.7.5 Intranasale Inokulation von PrV-UL36Δ22-248Δ2087-2981

Eine Infektion mit PrV-UL36Δ22-248Δ2087-2981 (10^6 PFU/ml) führte bei den Mäusen im gesamten Untersuchungszeitraum zu keinen klinischen Symptomen (Abb. 12).

Immunhistologisch war es lediglich bei einem Tier möglich, 48 h p.i. ein infiziertes Neuron im TG nachzuweisen.

4.1.7.6 Intranasale Inokulation von PrV-UL36(C₂₆S)

Die mittlere Überlebenszeit nach Infektion mit PrV-UL36(C₂₆S) lag bei 111 h p.i. mit einer Varianz zwischen 90 und 120 h p.i. (Abb. 12). Erste klinische Erscheinungen konnten bereits ab 48 h p.i. beobachtet werden. Kurz vor dem Tod zeigten die Tiere zunehmende Apathie und Anorexie unterbrochen von Phasen der Hyperaktivität. Aufgrund von Juckreiz im Kopfbereich zeigten die Tiere vermehrtes Kratzen mit Automutilationen und Hauterosionen. Bei Auftreten von hochgradigen Symptomen wurden die Mäuse euthanasiert.

Der immunhistologische Nachweis von PrV-Antigen gelang 24 h p.i. im respiratorischen Epithel der Nase (Abb. 11). Histologisch fanden sich vereinzelt Degenerationerscheinungen von respiratorischen Epithelzellen sowie submukös geringgradige mononukleäre Infiltrate. Der Antigennachweis in Neuronen erster Ordnung gelang erst 72 h p.i. Die Zahl infizierter Neuronen im TG erhöhte sich 96 h p.i. Aber erst ab 111 h p.i. war die Infektion im TG vergleichbar mit der PrV-Ka-Infektion nach 48 h p.i. (Abb. 11). Ebenfalls 72 h p.i. fanden sich einzelne infizierte Neuronen im *Ganglion pterygopalatinum* sowie im *Ganglion cervicale craniale*. Eine Infektion der höher gelegenen neuronalen Zentren fand erst kurz vor dem Tod der Tiere statt.

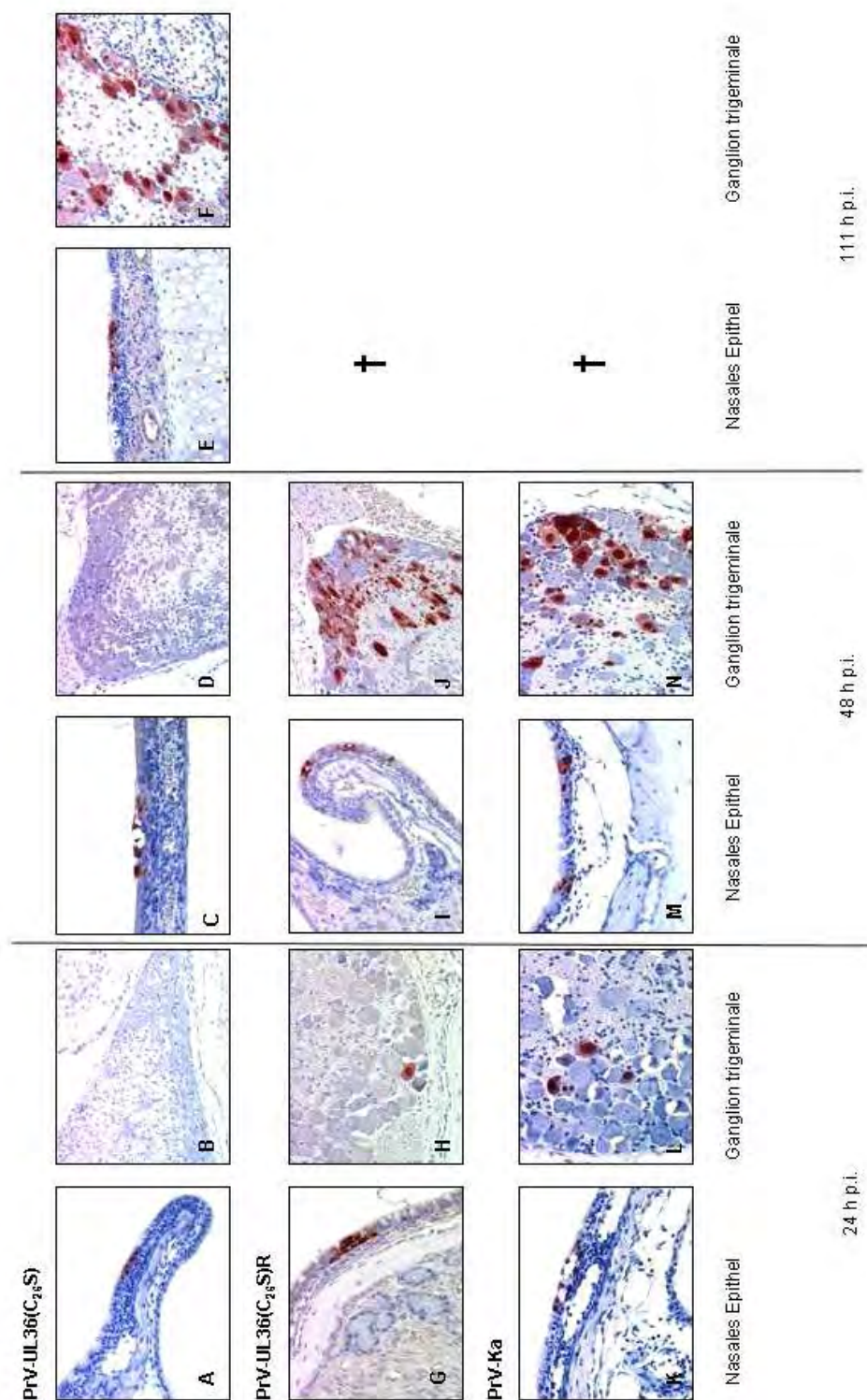


Abb. 11: **Immunhistologischer Nachweis von UL19-Antigen in Nase und Trigeminalganglion.**

Infektion mit PrV-UL36(C₂₆S), PrV-UL36(C₂₆S)R und PrV-Ka, n = 10 Tiere.

Quelle: Mutagenesis of the active site cysteine in the ubiquitin-specific protease contained in the large tegument protein pUL36 of pseudorabies virus impairs viral replication in vitro and neuroinvasion in vivo, Böttcher et al., J Virol. 2008 Jun;82(12)

Zu diesem Zeitpunkt war es möglich, infizierte Neuronen zweiter Ordnung und Gliazellen im kaudalen (Bregma -8,24) und interpolaren (Bregma -7,08) Anteil des Sp5 sowie Infektionen in kortikalen Neuronen (Bregma -1,7) nachzuweisen. Bei den infizierten Tieren kam es zu Gliazellproliferationen und Degeneration einzelner Neuronen, jedoch konnten keine Entzündungszellinfiltrate gefunden werden.

4.1.7.7 Intranasale Inokulation von PrV-UL36(C₂₆S)R

Die Revertante zeigte einen dem Wildtyp PrV-Ka vergleichbaren Phänotyp. Am zweiten Tag nach der Infektion zeigten die Mäuse Anorexie, Apathie sowie eine gekrümmte Körperhaltung. Zudem kam es bedingt durch Juckreiz und damit verbundenem Kratzen im Kopfbereich zu dermalen Erosionen mit Ulzerationen und Blutungen. Die Tiere verstarben 53 h p.i. (Abb. 12). Histologisch fanden sich Degeneration (Schwellung und Hypereosinophilie) und Nekrose im Bereich des respiratorischen Epithels der Nasenschleimhaut. Ebenfalls vereinzelt kam es zu lymphohistiozytären Infiltraten in der Mukosa. Entzündliche Veränderungen in den Ganglien und dem ZNS konnten nicht gefunden werden. Immunhistologisch ließ sich UL19-Antigen in degenerierten epithelialen Zellen des respiratorischen Anteils der Nasenhöhle ab 24 h p.i. nachweisen (Tab. 4).

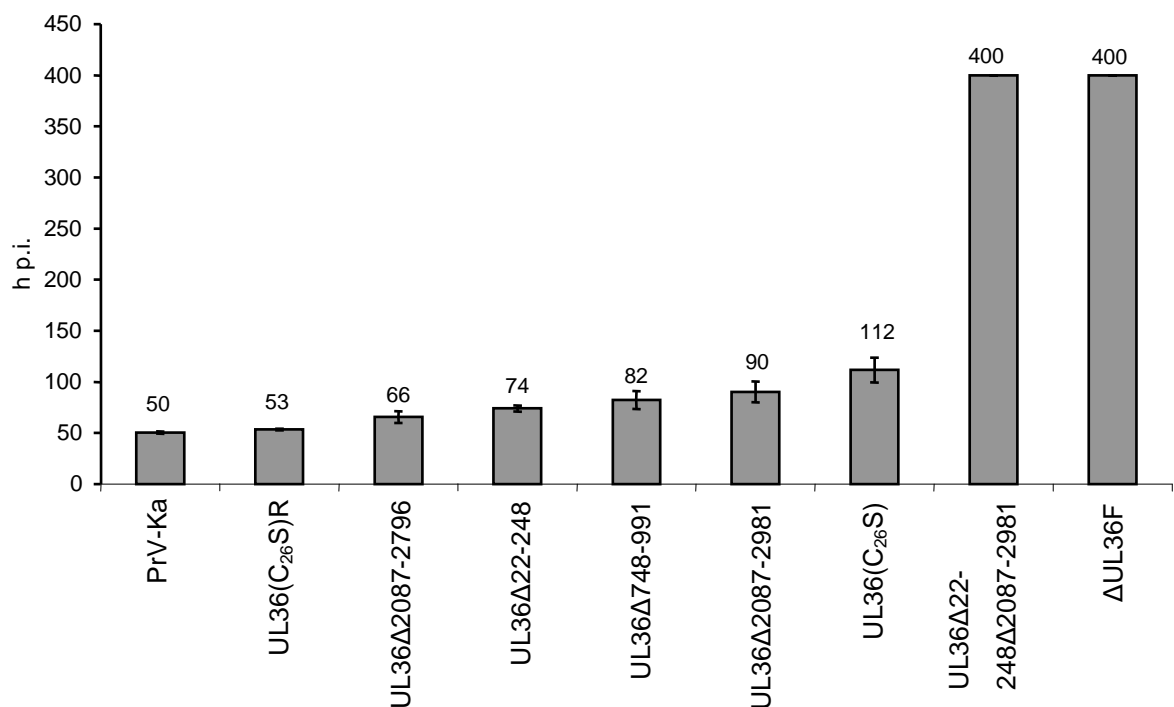


Abb. 12: Vergleichende Darstellung der Überlebenszeiten nach Infektion von UL36-Mutanten. n = 10 Tiere.

Eine Infektion von Neuronen im *Ganglion trigeminale* hatte zu diesem Zeitpunkt ebenfalls stattgefunden (Abb. 11). Es fanden sich 48 h p.i. infizierte Neuronen im *Ganglion pterygopalatinum*, im *Ganglion oticum* und im interpolaren Anteil des Sp5 (Bregma -6,72).

Tab. 4: **Intranasale Infektion mit PrV-Ka, PrV-UL36(C₂₆S)R und PrV-UL36(C₂₆S).**

Vergleichende Darstellung von mittlerer Überlebenszeit, Symptomen und Antigennachweis.

Standardabweichungen der Überlebenszeit finden sich in Klammern, n = 10 Tiere.

Symptome: - = keine, + = geringgradig, ++ = mittelgradig, +++ = hochgradig, † = tot.

Immunhistologie: - = nicht nachgewiesen.

Virus	PrV-Ka	PrV-UL36(C ₂₆ S)R	PrV-UL36C ₂₆ S)
<u>Mittlere Überlebenszeit in h</u>	50 (± 1,08)	53 (± 0,63)	112 (± 12,2)
<u>Symptome</u>			
1 d p.i.	-	-	-
2 d p.i.	+++	+++	+
3 d p.i.	†	+++	++
4 d p.i.		†	+++
5 d p.i.			†
<u>Immunhistologie</u>			
Nasenhöhle	1 d p.i.	1 d p.i.	1 d p.i.
Neuronen 1. Ordnung	1 d p.i.	1 d p.i.	3 d p.i.
Neuronen 2. Ordnung	2 d p.i.	2 d p.i.	4 d p.i.
Kortikale Neuronen	-	-	5 d p.i.

4.1.7.8 In-vivo-Charakterisierung von PrV-ΔUL21/US3

Für die Bestimmung der mittleren Überlebenszeit und die Untersuchung der Ausbreitung in neuronalen Zentren wurden in einem ersten Versuch 20 Mäuse

intranasal mit PrV-ΔUL21/US3 (10^6 PFU/ml) infiziert. Erst nach 408 h p.i. zeigte eine Maus klinische Symptome in Form von Apathie mit Seitenlage und Schnappatmung.

Um das klinische Bild nach Infektion mit dieser Virusmutante zu reproduzieren, wurden erneut 16 Mäuse intranasal infiziert. Ab 192 h p.i. traten bei fünf Tieren erste klinische Erscheinungen in Form von Ödem der Nasenrückenhaut und geringgradigem Juckreiz auf. Im weiteren Verlauf wurden 7 männliche Tiere apathisch und verstarben ab 288 h p.i. Sechs Tiere zeigten Juckreiz, der zu Hauterosionen im Kopfbereich führte. Das Allgemeinbefinden war jedoch zu keinem Zeitpunkt beeinträchtigt und es kam zur Rekonvaleszenz der Tiere. Bei drei Mäusen traten zu keiner Zeit klinische Symptome auf. Bei vier Tieren konnten mittels Western Blot 49 d p.i. Antikörper nachgewiesen werden. Eine Überinfektion mit PrV-Ka bei fünf Tieren führte zu keinen klinischen Erscheinungen im Untersuchungszeitraum.

Für einen dritten Infektionsversuch wurden 14 weibliche und 13 männliche Tiere verwendet. Bei einem männlichen Tier konnten 168 h p.i. Nasenrückenödem mit Juckreiz in der Flanke beobachtet werden. Insgesamt erkrankten zehn der 13 männlichen Tiere. Dabei reichte das klinische Bild von geringgradigem Juckreiz am gesamten Körper bis hin zu völliger Apathie mit Todesfolge. Insgesamt verstarben fünf Tiere ab 288 h p.i. Bei den weiblichen Tieren zeigten nur vier von 14 zunächst einen geringgradigen Juckreiz bei ungestörtem Sensorium. Ein weibliches Tier wurde im weiteren Verlauf apathisch und verstarb 408 h p.i., während die restlichen drei Tiere zwar Hauterosionen aufwiesen, jedoch die Infektion überlebten. Die restlichen zehn Weibchen zeigten zu keinem Zeitpunkt klinische Erscheinungen.

624 h nach der Infektion wurden die verbliebenden 13 weiblichen und sechs der männlichen Tiere mit PrV-Ka intranasal infiziert. 72 h p.i. verstarben vier weibliche Tiere nach Apathie und Juckreiz. Ein männliches Tier zeigte zu diesem Zeitpunkt einen hochgradigen Juckreiz im Kopfbereich sowie Hauterosionen und wurde euthanasiert. Zwei weitere weibliche Tiere verstarben nach 130 bzw. 168 h p.i. Die verbliebenen Tiere wurden ohne klinische Symptome mit 192 h p.i. getötet.

Zum Nachweis der Ausbreitung im ZNS wurde UL19-Antigen immunhistologisch dargestellt. Es fanden sich 24 h p.i. infizierte epitheliale Zellen in der *Pars nasalis pharyngis* und 48 h p.i. Antigen-positive Neuronen im TG (Abb. 14). 72 h p.i. fanden sich wenige infizierte Neuronen im *Ganglion cervicale craniale*. Histopathologisch konnten im Großhirn 72 h p.i. vereinzelt Gliazellknötchen und 96 h p.i. teils

perivaskulär, teils im Parenchym liegende lymphohistiozytäre Infiltrate nachgewiesen werden.

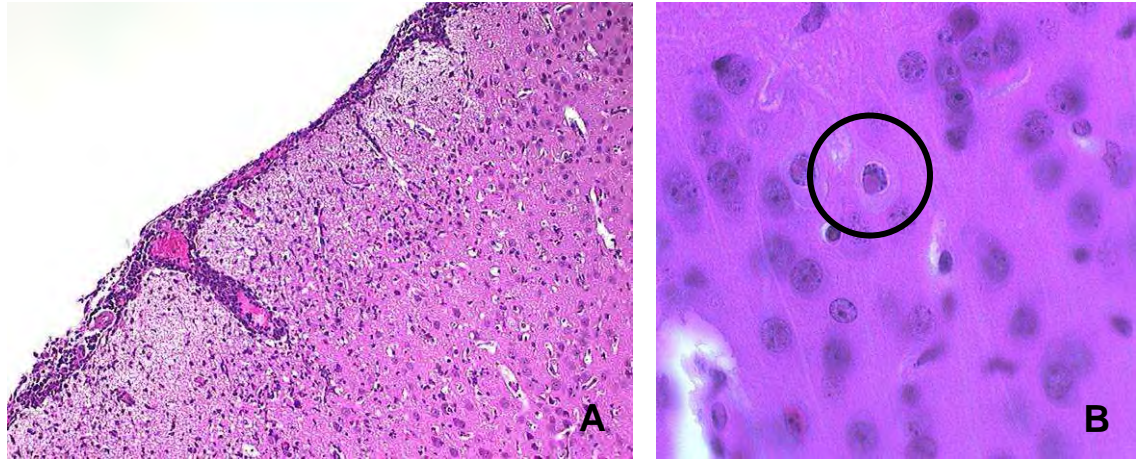


Abb. 13: **Großhirn 240 h nach Infektion mit PrV-AUL21/US3.** Submeningeal (A, x200) und perivaskulär fanden sich zahlreiche lymphohistiozytäre Infiltrate. Intranukleäre Einschlusskörperchen (B, x400) in Neuronen konnten ebenfalls nachgewiesen werden.

Neben dem *Ganglion oticum* und dem *Ganglion pterygopalatinum* waren 120 h p.i. auch infizierte Neuronen im Hirnstamm (Bregma -6,96; Abb. 14) zu finden. Ebenso wie im Trigeminalganglion stieg auch im Hirnstamm die Zahl infizierter Neuronen im weiteren Verlauf kaum an. Histopathologisch fanden sich im *Ganglion pterygopalatinum* Kernwandhyperchromasie und Hypereosinophilie in vereinzelt degenerierten Neuronen. Ab 168 h p.i. ließen sich immunhistologisch im lateralen ektorhinalen Kortex (Bregma -2,80) infizierte Neuronen nachweisen. Histologisch fanden sich im Großhirn sowohl submeningeal als auch perivaskulär lymphohistiozytäre Infiltrate (Abb. 13A). Sowohl die entzündlichen Veränderungen als auch die Zahl infizierter Neuronen nahm im weiteren Verlauf der Infektion im Großhirn drastisch zu. Neben entzündlichen Infiltraten und Gliazellproliferationen in Groß- und Kleinhirn fanden sich bei den betroffenen Tieren Auflockerungen im Parenchym des Großhirns. Neuronen zeigten degenerative Veränderungen in Form von Kernwandhyperchromasie und Hypereosinophilie. Vereinzelt konnten in Neuronen intranukleäre Einschlusskörperchen vom Typ Cowdry A nachgewiesen werden (Abb. 13B). Infizierte Neuronen fanden sich in großer Zahl u.a. im motorischen und somatosensorischen Kortex (Bregma 1,34; Abb. 14).

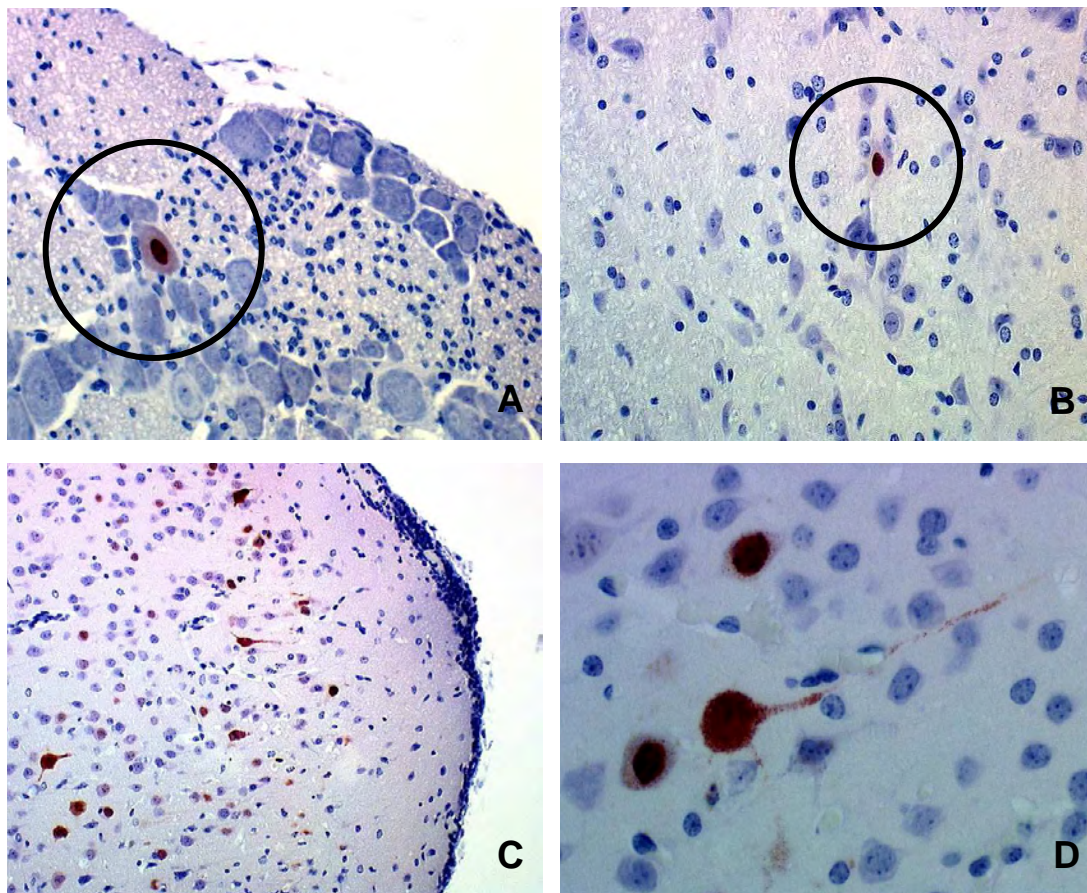


Abb. 14: **Immunhistologie zum Nachweis von UL19-Antigen (rotbraune Färbung) in Mäusen nach Infektion mit PrV- Δ UL21/US3.** Im Trigeminalganglion (A, x 200) fanden sich 48 h p.i. nur einzelne infizierte Neuronen, ebenso im Hirnstamm 72 h p.i. (B, x 200). 240 h p.i. konnten im Bereich des Kortex (C, x 200 und D, x 400) zahlreiche infizierte Neuronen nachgewiesen werden.

4.2 In-vitro-Untersuchungen

4.2.1 Herstellung und In-vitro-Charakterisierung von PrV- Δ UL21/US3/UL35mCherry

Zur Herstellung des rekombinaten Virus wurden das Plasmid pUC-UL35mCherry und virale DNA von PrV- Δ UL21/US3 in der Zelllinie 109 kotransfiziert. Die Transfektionsnachkommen wurden mittels Fluoreszenzmikroskopie überprüft. Da die Virusmutante bereits eine Rekombination mit dem EGFP besaß, wurden EGFP- und mCherry-exprimierende Virusmutanten isoliert und durch wiederholte Plaquereinigungen bis zur Homogenität gereinigt. Anschließend erfolgte die In-vitro-Charakterisierung von PrV- Δ UL21/US3/UL35mCherry.

Die Erstellung von **Ein-Schritt-Wachstumskurven** erfolgte nach Infektion der Zelllinien 109 und 832 mit dem Wildtyp PrV-Ka und den PrV-Mutanten PrV-UL35GFP, PrV- Δ UL21/US3 und PrV- Δ UL21/US3/UL35mCherry. In Abb. 15 sind die Ergebnisse der anschließenden Titration dargestellt. Dabei war PrV-UL35GFP sowohl im Replikationsverhalten als auch im Bezug auf den erreichten Titer mit PrV-Ka vergleichbar. PrV- Δ UL21/US3 und PrV- Δ UL21/US3/UL35mCherry zeigten einen ca. 100fach verminderten Virustiter. In der Zelllinie 109 erschien die Replikation von PrV- Δ UL21/US3 verzögert.

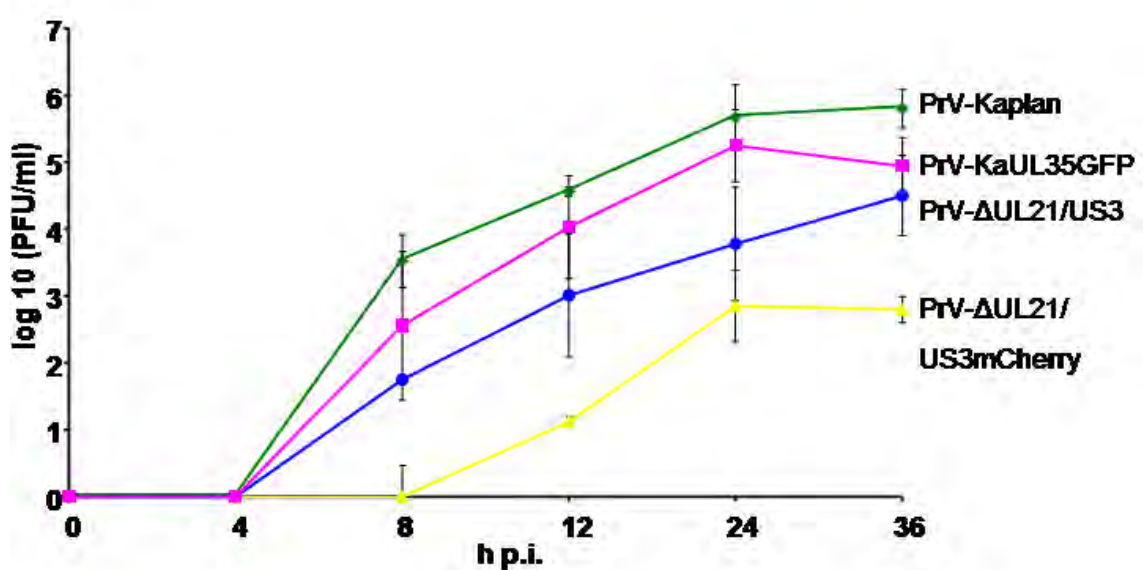


Abb. 15: **Ein-Schritt-Wachstumskurve nach Infektion der Zelllinie 832.** Gezeigt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen mit den entsprechenden Standardabweichungen.

Die Bestimmung der **Plauegrößen** erfolgte ebenfalls auf den beiden Zelllinien. Die berechneten Werte sind in Abb. 16 dargestellt. Die ermittelten Plauegrößen waren nach Infektion mit PrV-UL35GFP um etwa 30 %, nach Infektion mit PrV- Δ UL21/US3 und PrV- Δ UL21/US3/UL35mCherry sogar um ca. 80 % im Vergleich zum Wildtypvirus reduziert.

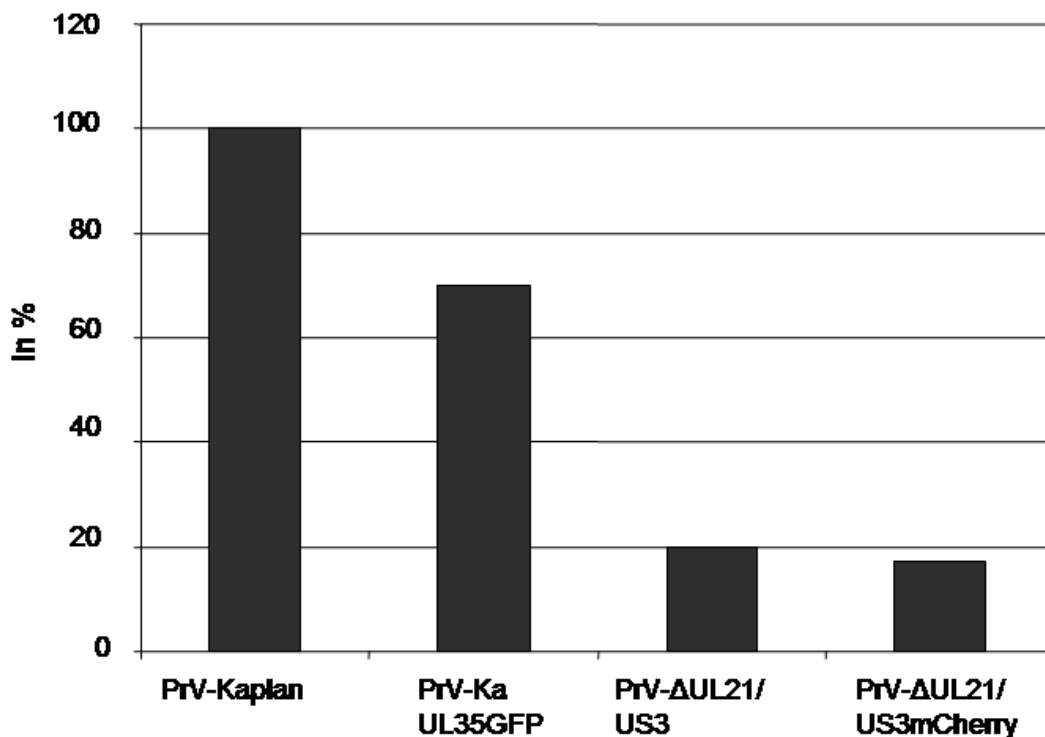


Abb. 16: **Plaquegrößen gemessen nach Infektion der Zelllinie 832.** Die ermittelten Werte stammen aus drei unabhängigen Experimenten.

Der durchgeführte **Southern Blot** zeigte unter Verwendung von Sonden, die für die Gene UL21, US3 und UL35 spezifisch waren, das Fehlen von UL21 und US3 sowie das Vorhandensein von UL35 bei PrV-ΔUL21/US3/UL35mCherry.

Im **Western Blot** konnte durch UL21- und US3- Antikörper in der PrV-Mutante keine spezifische Bindung nachgewiesen werden. Zur Kontrolle wurden Antikörper gegen pUL37, pUL35 und GFP verwendet. Bei Verwendung dieser drei Antikörper konnte eine Bindung bei PrV-ΔUL21/US3/UL35mCherry nachgewiesen werden.

4.2.2 Untersuchung des intraaxonalen Transportes mit konfokaler Laser-Scan-Mikroskopie

Zur Untersuchung des intraaxonalen Transportes von PrV wurden primäre murine Neuronenkulturen aus den oberen Zervikalganglien von Rattenembryonen verwendet. Die Ganglien wurden entweder als Explantate auf Petrischalen oder im Drei-Kammer-Modell angezüchtet.

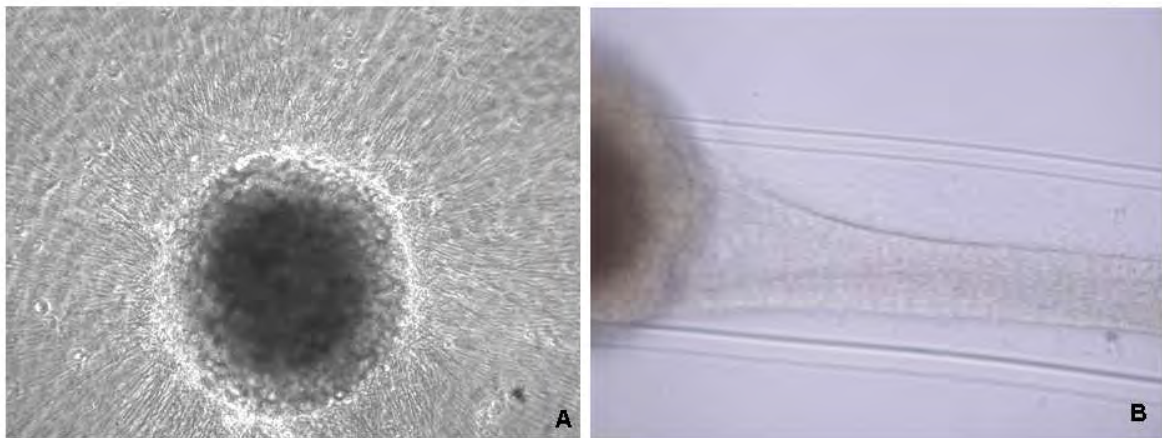


Abb. 17: **Primäre murine Neuronenkulturen.**

A: Oberes Zervikalganglion als Explantat. B: Chamberlain-Kammer mit Neuronenkultur.

Aus den Explantaten wuchsen sternförmig die Axone aus (Abb. 17), es befanden sich aber auch einzelne Neuronen und wenige Fibroblasten in der Peripherie. In den Chamberlain-Kammern wuchsen die Axone der einzelnen Neuronen entlang der parallelen Rillen im Boden der Petrischalen und bildeten dabei dicke Stränge (Abb. 17). Sobald die Axone die dritte Kammer (N-Kammer) erreicht hatten, wurden die Kulturen für die Untersuchungen genutzt.

Die neuronalen Kulturen wurden mit grün fluoreszierenden EGFP- oder rot fluoreszierenden mCherry-markierten PrV-Virionen infiziert. Die Fusion des Kapsidproteins UL35 mit den Fluoreszenzproteinen EGFP (Desai und Person 1998) oder mCherry (Shaner et al. 2005; Seefeldt et al. 2008; Graewe et al. 2009) ermöglichte die Beobachtung des intraaxonalen Transportes der Kapside mittels konfokaler Laser-Scan-Mikroskopie. In Zeitrafferaufnahmen wurden Geschwindigkeit und zurückgelegte Wegstrecke bei einzelnen fluoreszierenden Kapsiden gemessen (Tab. 5). Durch die Benutzung einer auf 37 °C aufheizbaren Inkubationskammer war es möglich, die Neuronen über einen längeren Zeitraum unter optimalen Bedingungen zu beobachten. In Abb. 18 sind die Axone von primären Neuronen dargestellt. Nach Anfärbung mit dem Membranfarbstoff DiI sind deutliche Auftreibungen („varicosities“) entlang der Axone zu sehen. Der Nachweis von reifen Neuronen erfolgte mit β -Tubulin.

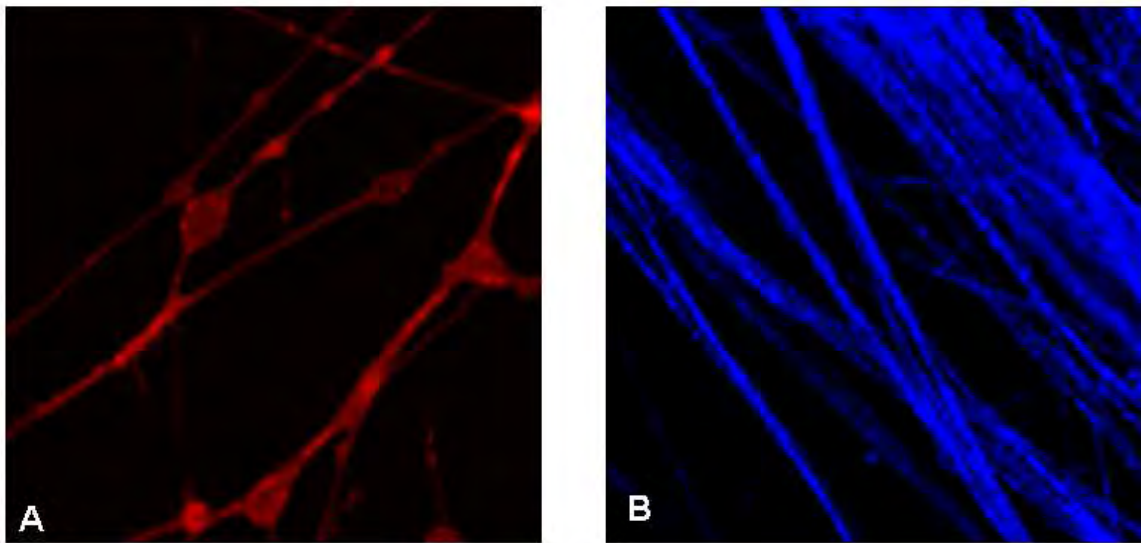


Abb. 18: **Primäre murine Neuronenkulturen aus oberen Zervikalganglien.**

A: angefärbt mit dem Membranfarbstoff DiI (rot). B: Immunfluoreszenz mit β -Tubulin (blau).

4.2.2.1 Untersuchungen zum retrograden intraaxonalen Transport

Die Untersuchung des retrograden, zum Zellkern hinführenden Transportes wurde unmittelbar im Anschluß an die Infektion von Ganglienexplantaten vorgenommen. Die Messung der Geschwindigkeit (Abb. 19) sowie der zurückgelegten Wegstrecke erfolgte nur mit solchen Kapsiden, bei denen eine gerichtete Bewegung in Axonen nachzuweisen war. Dabei erfolgte der retrograde Transport bei allen untersuchten PrV-Mutanten nicht kontinuierlich. Die fluoreszierenden Kapside kamen häufig während des Transportes zum Zellkern zum Stillstand oder bewegten sich sogar in anterograder Richtung (bidirektionaler Transport). Bei einzelnen Kapsiden konnte nach dem Stillstand kein weiterer Transport in Richtung Zellkern während der Beobachtungszeit nachgewiesen werden.

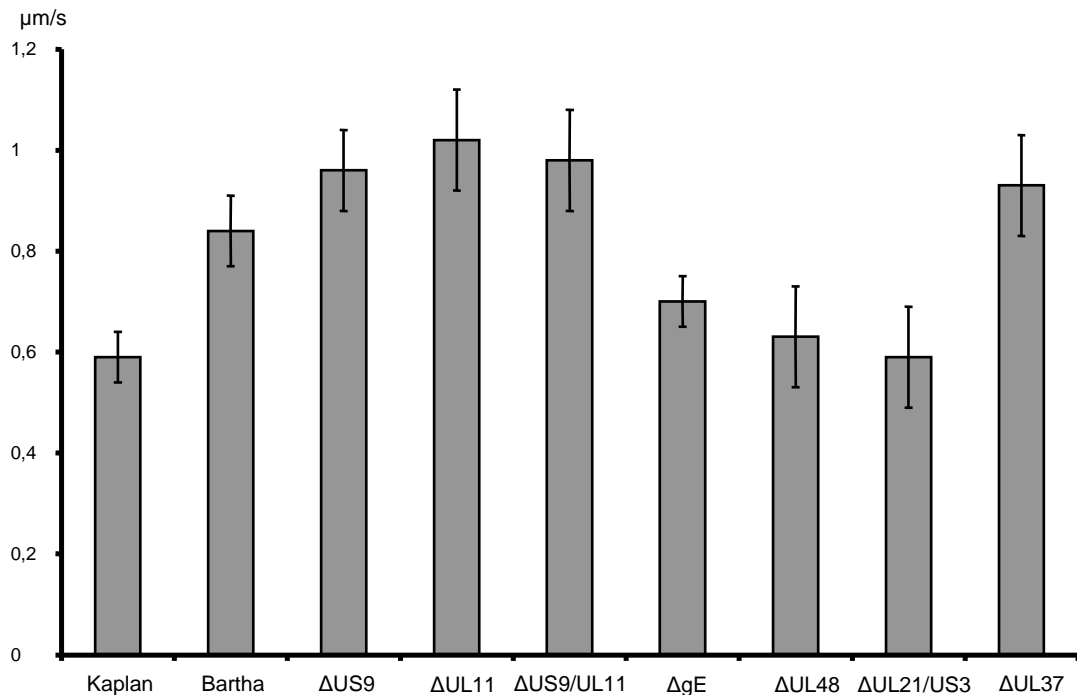


Abb. 19: **Mittlere retrograde Transportgeschwindigkeiten.** Infektion muriner primärer Neuronenkulturen aus oberen Zerkikalganglien von Rattenembryonen. Mit 0,95-Konfidenzintervall.

In Tab. 5 sind die ermittelten Geschwindigkeiten sowie die zurückgelegte Wegstrecke dargestellt. Dabei konnten mittlere Geschwindigkeiten zwischen 0,6 und 1 $\mu\text{m/s}$ gemessen werden.

4.2.2.1.1 PrV-Kaplan

Primäre Neuronenkulturen wurden mit EGFP-markiertem PrV-Kaplan (1×10^7 PFU) infiziert und sofort im Anschluß untersucht. Bereits wenige Minuten nach der Infektion konnten erste fluoreszierende Partikel in den Axonen beobachtet werden. Der Großteil der fluoreszierenden Kapside bewegte sich einzeln intraaxonal. Es konnten auch fluoreszierende Partikel, die sich frei im Medium ungerichtet fortbewegten, beobachtet werden. In den Axonen fanden sich bereits zu diesem Zeitpunkt zahlreiche stillstehende Kapside. Nach Infektion mit PrV-Kaplan konnte eine retrograde Geschwindigkeit von 0,59 $\mu\text{m/s}$ festgestellt werden (Abb. 19). Im Mittel konnten die Viruspartikel über eine Strecke von 34 μm beobachtet werden (Tab. 5). In Abb. 20 sind die Geschwindigkeiten einzelner PrV-Ka-Partikel dargestellt. Es zeigte sich, dass die Mehrzahl der Kapside eine Geschwindigkeit zwischen 0,3 und 0,9 $\mu\text{m/s}$ aufwies.

Tab. 5: Übersicht über die gemessenen retrograden Geschwindigkeiten sowie die mittleren Beobachtungsstrecken.

Infektion primärer muriner Neuronenkulturen mit den einzelnen Virusmutanten.
Standardabweichungen in Klammern. n.d. = nicht durchgeführt.

Virusmutante	Geschwindigkeit ($\mu\text{m/s}$) retrograd	0,95- Konfidenz- intervall	Strecke (μm)	Anzahl (n)
PrV-Kaplan	0,59 ($\pm 0,26$)	0,54 – 0,64	33,58 ($\pm 15,4$)	120
PrV-Bartha	0,84 ($\pm 0,27$)	0,77 – 0,91	24,1 ($\pm 10,3$)	56
PrV- ΔUS9	0,96 ($\pm 0,31$)	0,87 – 1,04	38,4 ($\pm 12,5$)	50
PrV- ΔUL11	1,02 ($\pm 0,27$)	0,92 – 1,12	36,7 ($\pm 15,1$)	29
PrV- $\Delta\text{UL11/US9}$	0,98 ($\pm 0,25$)	0,87 – 1,09	40,7 ($\pm 19,4$)	21
PrV- ΔgE	0,7 ($\pm 0,36$)	0,65 – 0,75	39,0 ($\pm 17,0$)	171
PrV- ΔUL48	0,63 ($\pm 0,28$)	0,53 – 0,73	21,14 ($\pm 10,1$)	30
PrV- $\Delta\text{UL21/US3}$	0,59 ($\pm 0,31$)	0,49 – 0,69	22,29 ($\pm 9,0$)	35
PrV- ΔUL37	0,93 ($\pm 0,35$)	0,82 – 1,04	34,4 ($\pm 12,7$)	40
PrV-UL36(C ₂₆ S)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

4.2.2.1.2 PrV-Bartha

Die Infektion mit PrV-Bartha/UL35EGFP (1×10^7 PFU) ergab eine mittlere retrograde intraaxonale Transportgeschwindigkeit von 0,84 $\mu\text{m/s}$ (Abb. 19). Ebenso wie nach PrV-Kaplan-Infektion bewegten sich die Viruspartikel nicht kontinuierlich in den Axonen, sondern zeigten Phasen des Stillstandes oder des bidirektionalen Transportes. Fluoreszierende Partikel konnten im Mittel über eine Strecke von 24,1 μm beobachtet werden (Tab. 5).

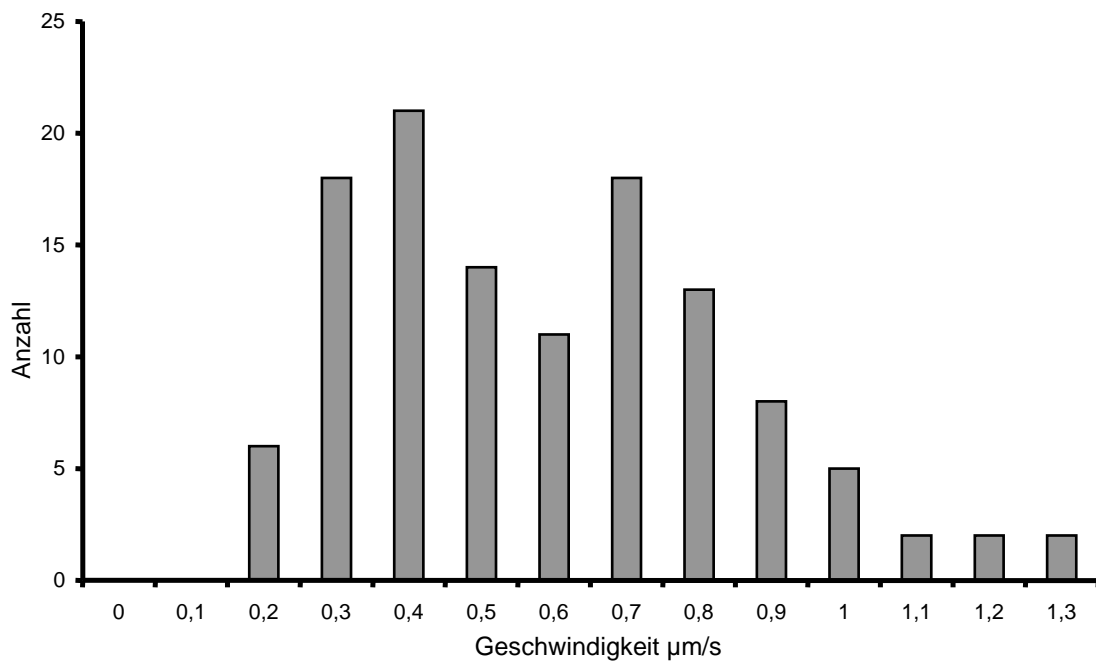


Abb. 20: Übersicht über die Verteilung der gemessenen retrograden Geschwindigkeiten einzelner Partikel nach PrV-Ka-Infektion.

4.2.2.1.3 PrV- ΔUS9

Die mittlere retrograde Geschwindigkeit nach PrV- $\Delta\text{US9}/\text{UL35EGFP}$ -Infektion (1×10^7 PFU) lag bei $0,96 \mu\text{m/s}$ (Abb. 19) mit einer mittleren Beobachtungsstrecke von $38,4 \mu\text{m}$ (Tab. 5).

4.2.2.1.4 PrV- ΔUL11

Nach Infektion mit PrV- $\Delta\text{UL11}/\text{UL35EGFP}$ (1×10^7 PFU) von primären Neuronenkulturen konnte eine mittlere retrograde Geschwindigkeit von $1,02 \mu\text{m/s}$ (Abb. 19) gemessen werden. Die Beobachtung erfolgte im Mittel über eine Strecke von $36,7 \mu\text{m}$ (Tab. 5).

4.2.2.1.5 PrV- $\Delta\text{UL11}/\text{US9}$

Eine Infektion von murinen Neuronen aus oberen Zervikalganglien mit der kapsid-EGFP-markierten Doppeldeletionsmutante PrV- $\Delta\text{UL11}/\text{US9}/\text{UL35EGFP}$ (1×10^7 PFU) ergab eine mittlere Geschwindigkeit des retrograden intraaxonalen Transportes von $0,98 \mu\text{m/s}$ (Abb. 19) bei einer mittleren Beobachtungsstrecke von $40,7 \mu\text{m}$ (Tab. 5). Auch hier zeigten einzelne Partikel bidirektionalen Transport oder stoppten ihre intraaxonale Bewegung.

4.2.2.1.6 PrV-ΔgE

PrV-ΔgE/UL35EGFP (1×10^7 PFU) zeigte in Neuronenkulturen aus murinen oberen Zervikalganglien einen mittleren retrograden Transport von $0,7 \mu\text{m/s}$ (Abb. 19) bei einer mittleren Beobachtungsstrecke von $39,0 \mu\text{m}$ (Tab. 5). Das bei den anderen Virusmutanten gefundene Transportverhalten retrograd wandernder Partikel konnte auch hier beobachtet werden.

4.2.2.1.7 PrV-ΔUL48

Die Infektion mit PrV-ΔUL48/UL35EGFP (1×10^7 PFU) ergab eine gemessene mittlere retrograde Geschwindigkeit in Axonen von $0,63 \mu\text{m/s}$ (Abb. 19). Die mittlere Beobachtungsstrecke lag bei $21,1 \mu\text{m}$ (Tab. 5).

4.2.2.1.8 PrV-ΔUL21/US3

Die Doppeldeletionsmutante PrV-ΔUL21/US3 enthielt, assoziiert an das UL35-Protein, ein rot fluoreszierendes Protein (mCherry) und wurde auf komplementierenden Zellen angezogen. Anschließend erfolgte die Infektion (1×10^7 PFU) primärer Neuronenkulturen. Die gemessene retrograde Geschwindigkeit lag bei $0,59 \mu\text{m/s}$ (Abb. 19). Auch hier zeigten die Viruspartikel das bereits bei den anderen Virusmutanten beschriebene Transportverhalten. Die mittlere Beobachtungsstrecke lag bei $22,3 \mu\text{m}$ (Tab. 5).

4.2.2.1.9 PrV-ΔUL37

Die Infektion neuronaler Kulturen mit PrV-ΔUL37/UL35EGFP (1×10^7 PFU) ergab eine mittlere retrograde Geschwindigkeit von $0,93 \mu\text{m/s}$ (Abb. 19) bei einer mittleren Beobachtungsstrecke von $34,4 \mu\text{m}$ (Tab. 5). Der retrograde Transport einzelner fluoreszierender Viruspartikel war bidirektional, ebenso kamen einzelne Partikel in den Axonen zum Stillstand.

4.2.2.1.10 PrV-UL36(C₂₆S)

Es konnte kein retrograder Transport nach Infektion mit PrV-UL36(C₂₆S)/UL35EGFP aufgrund des zu geringen Virustiters festgestellt werden.

4.2.2.2 Untersuchungen zum anterograden Transport

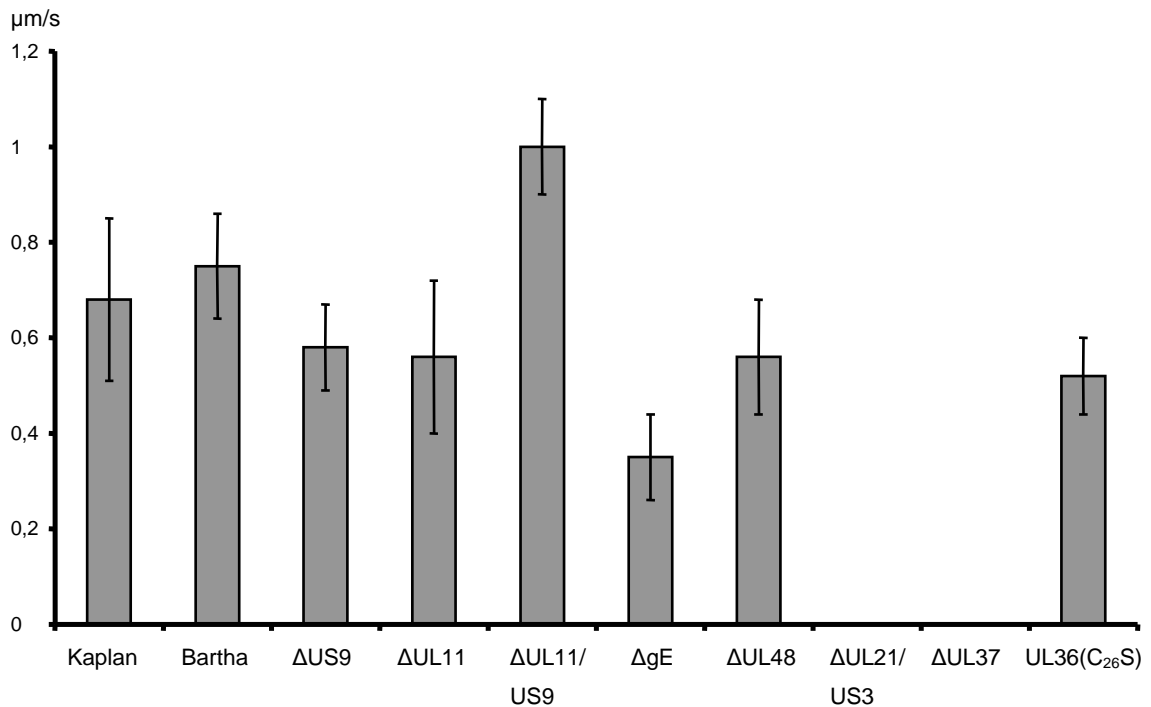


Abb. 21: **Darstellung der mittleren anterograden Ausbreitungsgeschwindigkeiten.**
 Infektion muriner primärer Neuronenkulturen aus oberen Zervikalganglien von Rattenembryonen. Mit 0,95-Konfidenzintervall.

Für die Darstellung und Messung des anterograden, vom Zellkern wegführenden Transportes wurde das Drei-Kammer-Modell verwendet. Die mit den einzelnen Virusmutanten infizierten Kulturen wurden für 24 bis 48 h bei 37 °C inkubiert und anschließend mittels konfokaler Laser-Scan-Mikroskopie untersucht. Wie bereits beim retrograden Transport, zeigten auch hier einzelne Kapside bidirektionale Transportbewegungen. Jedoch kam es bei den intraaxonalen Transportprozessen nur selten zum Stillstand der Virionen. In Abb. 21 sind die gemessenen anterograden Geschwindigkeiten dargestellt.

Tab. 6 : **Übersicht über die gemessenen mittleren anterograden Geschwindigkeiten sowie die mittleren Beobachtungsstrecken.**

Infektion primärer muriner Neuronenkulturen mit den einzelnen Virusmutanten.

Standardabweichungen in Klammern. n.d. = nicht durchgeführt, n.b. = nicht beobachtet.

Virusmutante	Geschwindigkeit ($\mu\text{m/s}$) anterograd	0,95- Konfidenz- intervall	Strecke (μm)	Anzahl (n)
PrV-Kaplan	0,68 (\pm 0,37)	0,5 – 0,85	38,6 (\pm 12,4)	17
PrV-Bartha	0,75 (\pm 0,34)	0,64 – 0,86	38,4 (\pm 16,5)	35
PrV- Δ US9	0,58 (\pm 0,23)	0,49 – 0,67	24,8 (\pm 8,9)	23
PrV- Δ UL11	0,56 (\pm 0,34)	0,4 – 0,72	26,8 (\pm 19,3)	17
PrV- Δ UL11/US9	1,00 (\pm 0,31)	0,9 – 1,1	38,4 (\pm 13,9)	40
PrV- Δ gE	0,35 (\pm 0,17)	0,26 – 0,44	31,4 (\pm 15,4)	14
PrV- Δ UL48	0,53 (\pm 0,18)	0,41 – 0,65	55,9 (\pm 12,49)	9
PrV- Δ UL21/US3	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
PrV- Δ UL37	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
PrV-UL36(C ₂₆ S)	0,52 (\pm 0,25)	0,43 – 0,6	24,51 (\pm 9,8)	35

4.2.2.2.1 PrV-Kaplan

Die Infektion mit EGFP-markierten PrV-Kaplan (1×10^4 PFU) führte 24 h p.i. zu einer kräftigen Fluoreszenz von nahezu allen primären Neuronen. In den Axonen fanden sich zahlreiche, sich kontinuierlich bewegende fluoreszierende Partikel. Es konnte eine mittlere anterograde Geschwindigkeit von 0,68 $\mu\text{m/s}$ ermittelt werden (Abb. 21). Die mittlere beobachtete Strecke lag bei 38,6 μm (Tab. 6).

4.2.2.2.2 PrV-Bartha

PrV-Bartha/UL35EGFP (1×10^4 PFU) führte 24 h p.i. zu einer intensiven Infektion primärer Neuronenkulturen, mit Kapsiden im Perikaryon und im Axon (Abb. 22A). Die Mehrzahl der Kapside zeigten eine gerichtete anterograde Transportrichtung mit Geschwindigkeiten zwischen 0,4 und 1 $\mu\text{m/s}$ (Abb. 22B) sowie einer mittleren Geschwindigkeit von 0,75 $\mu\text{m/s}$ (Abb. 21). Die beobachtete Strecke lag bei 38,4 μm (Tab. 6).

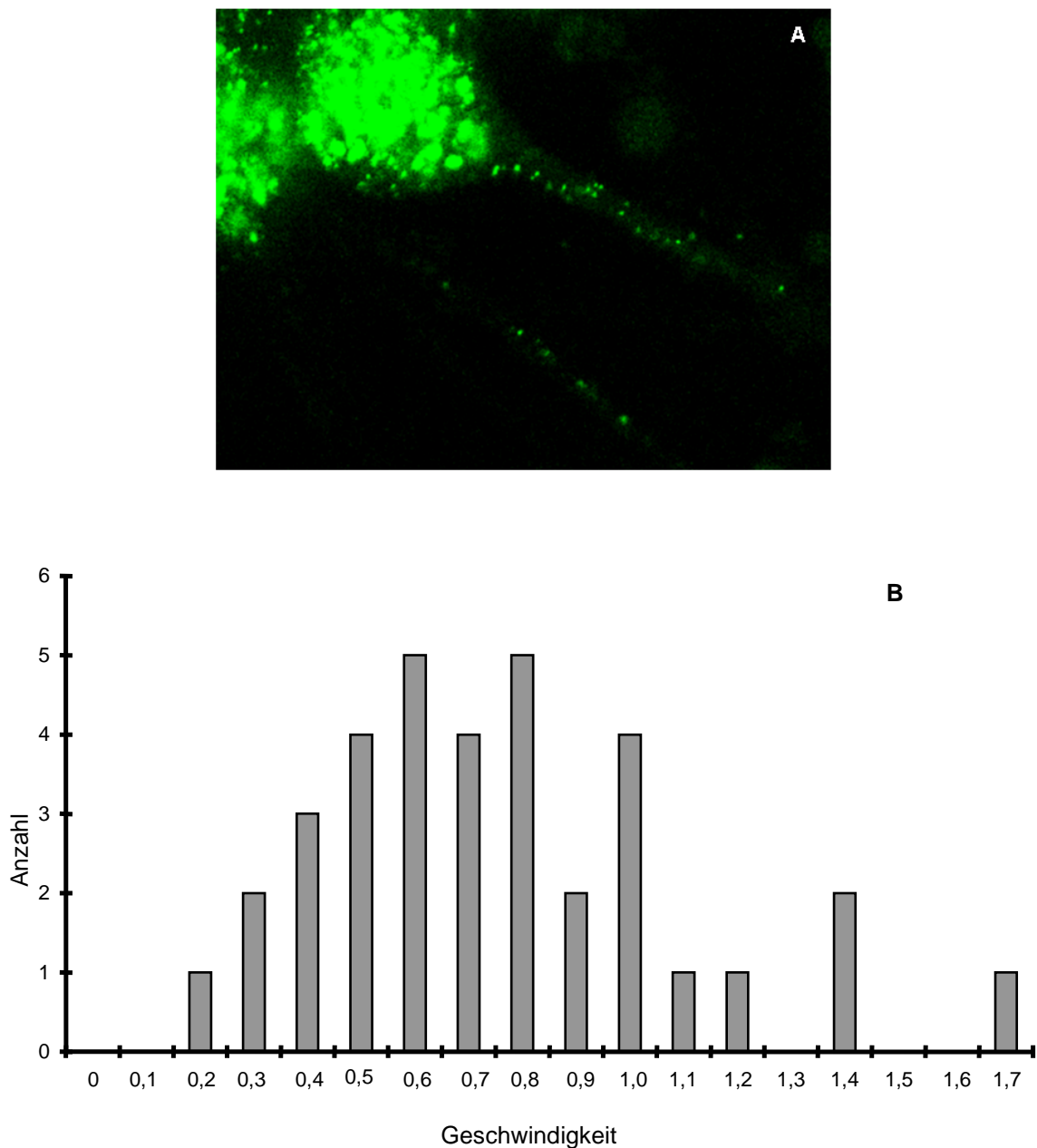


Abb. 22: **A:** Neuronen (grün) 24 h p.i. nach Infektion mit PrV-Bartha/UL35EGFP.

B: Übersicht über die Verteilung der gemessenen anterograden Geschwindigkeiten bei einzelnen Viruspartikeln von PrV-Bartha.

4.2.2.2.3 PrV-ΔUS9

Die Infektion mit PrV-ΔUS9/UL35EGFP (1×10^4 PFU) ergab 24 h p.i. zwar einzelne infizierte Neurone (Abb. 23A), jedoch konnte kein anterograder Transport beobachtet werden. Die Anzahl infizierter Neurone nahm 48 h p.i. zu (Abb. 23B). Die zu diesem Zeitpunkt gemessene mittlere anterograde Geschwindigkeit lag bei $0,58 \mu\text{m/s}$ (Abb. 21) bei einer mittleren Beobachtungstrecke von $24,8 \mu\text{m}$ (Tab. 6).

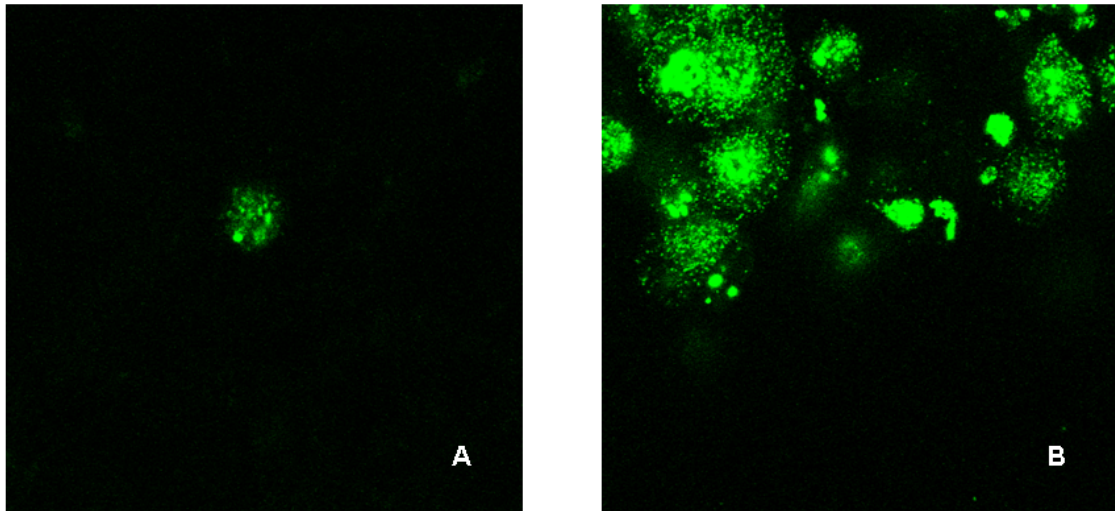


Abb. 23: **Primäre murine Neuronenkultur infiziert mit PrV-ΔUS9/UL35EGFP.**

A: 24 h p.i. zeigen nur einzelne Neurone eine grüne Fluoreszenz; **B:** 48 h p.i. war die Anzahl grün fluoreszierender Neurone deutlich erhöht.

4.2.2.2.4 PrV-ΔUL11

Ebenso wie nach PrV-ΔUS9-Infektion konnten in primären Neuronenkulturen nach Infektion mit PrV-ΔUL11/UL35EGFP (1×10^4 PFU) nur einzelne infizierte Zellen 24 h p.i. nachgewiesen werden. Eine sehr starke Zunahme der Anzahl infizierter Neurone konnte 48 h p.i. beobachtet werden. Die gemessene anterograde Ausbreitungsgeschwindigkeit fluoreszierender Partikel ergab $0,56 \mu\text{m/s}$ (Abb. 21) sowie eine mittlere Beobachtungstrecke von $26,8 \mu\text{m}$ (Tab. 6).

4.2.2.2.5 PrV-ΔUL11/US9

Nach Infektion mit PrV-ΔUL11/US9/UL35EGFP (1×10^4 PFU) waren 24 h p.i. einzelne grün fluoreszierende Zellen zu beobachten. Ebenso wie nach Infektion mit PrV-ΔUS9 und PrV-ΔUL11 konnten anterograde intraaxonale Transportprozesse einzelner Kapside erst 48 h p.i. nachgewiesen werden. Bei einer mittleren Beobachtungstrecke von $38,4 \mu\text{m}$ (Abb. 21) lag die anterograde Geschwindigkeit bei $1,0 \mu\text{m/s}$ (Tab. 6).

4.2.2.2.6 PrV-ΔgE

Die Infektion mit PrV-ΔgE/UL35EGFP (1×10^4 PFU) ergab 24 h p.i. eine mittlere anterograde Geschwindigkeit von $0,35 \mu\text{m/s}$ (Abb. 21) bei einer Beobachtungsstrecke von $31,4 \mu\text{m}$ (Tab. 6).

4.2.2.2.7 PrV-ΔUL48

Nach Infektion von primären Neuronenkulturen mit PrV-ΔUL48/UL35EGFP (1×10^4 PFU) konnte eine mittlere anterograde Geschwindigkeit von $0,53 \mu\text{m/s}$ (Abb. 21) gemessen werden. Die mittlere Beobachtungsstrecke lag bei $55,9 \mu\text{m}$ (Tab. 6).

4.2.2.2.8 PrV-ΔUL21/US3

In primären murinen Neuronenkulturen infiziert mit PrV-ΔUL21/US3/UL35mCherry (1×10^4 PFU) war es 24 h p.i. nicht möglich, anterograde Transportbewegungen fluoreszierender Partikel nachzuweisen (Abb. 21). Die Zellkörper zeigten zu diesem Zeitpunkt Degenerationserscheinungen in Form von Abkugeln und Ablösen von der Unterlage. Durch Beobachtungen zu den Zeitpunkten 4, 6, 8 und 12 h p.i. konnte zwar eine Zunahme viralen Antigens in Zellkern und Zytoplasma beobachtet werden (Abb. 24), jedoch kein anterograde intraaxonaler Transport.

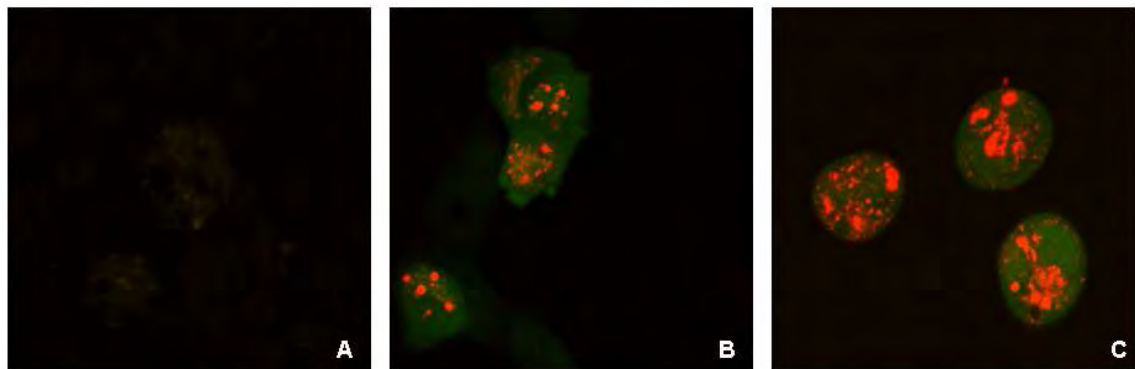


Abb. 24: **Primäre murine Neuronenkulturen (rote Färbung) infiziert mit PrV-ΔUL21/US3/UL35mCherry. A: 4 h p.i., B: 8 h p.i., C: 24 h p.i..**

4.2.2.2.9 PrV-ΔUL37

Nach Infektion primärer Neuronenkulturen mit PrV-ΔUL37/UL35EGFP (1×10^4 PFU) konnte 24 h p.i. zwar in den Perikaryen eine diffuse grüne Fluoreszenz beobachtet werden, jedoch zeigten keine Partikel anterograde Transportbewegungen (Abb. 21). In

den Axonen konnten vereinzelt stillstehende fluoreszierende Partikel nachgewiesen werden.

4.2.2.2.10 PrV-UL36(C₂₆S)

Nach Infektion primärer muriner Neuronenkulturen mit PrV-UL36(C₂₆S) /UL35EGFP (1×10^4 PFU) war es 24 h p.i. möglich eine Infektion von rund 90% aller Neuronen nachzuweisen. Die gemessene Geschwindigkeit anterograd transportierter Partikel lag bei 0,52 $\mu\text{m/s}$ (Abb. 21) mit einer mittleren Beobachtungsstrecke von 24,5 μm (Tab. 6).

4.2.3 Ultrastrukturelle Untersuchung des neuronalen Transportes an primären Neuronenkulturen

Zur Untersuchung des intraaxonalen Transportes von PrV wurden primäre murine Neuronenkulturen aus den oberen Zervikalganglien von Rattenembryonen verwendet. Die Ganglien wurden als Explantate auf Objektträgern in Glaspetrischalen angezüchtet. Aus den Explantaten wuchsen radiär die Axone aus. Einzelne Neuronen und Fibroblasten waren auch verteilt auf dem Objektträger zu finden. Die Neuronen zeichneten sich durch einen runden Zellkörper, der einen abgerundeten Zellkern sowie mäßig viel Zytoplasma enthielt, aus. Aus dem Zellkörper wuchsen jeweils ein bis zwei lange Axone aus. Elektronenmikroskopisch konnten die Axone durch das Vorhandensein von zahlreichen, parallel angeordneten Mikrotubuli sowie dem Fehlen von rauem endoplasmatischem Retikulum identifiziert werden. In Zellkultur bilden die Axone von primären Neuronen an ihrem Endsegment Wachstumskegel aus (Yamada et al. 1971). Diese konnten jedoch nicht bei den hier verwendeten Neuronenkulturen gefunden werden. Entlang der Mikrotubuli werden in nicht infizierten und infizierten Neuronen zahlreiche Neurovesikel transportiert (Abb. 25). Diese Vesikel besitzen eine Größe von ca. 100 nm. Im Inneren findet sich ein dunkler, elektronendichter Bereich. Außen sind diese Vesikel durch eine Membran begrenzt.

Fibroblasten waren durch ihr spindelförmiges Aussehen von Nervenzellen zu unterscheiden.

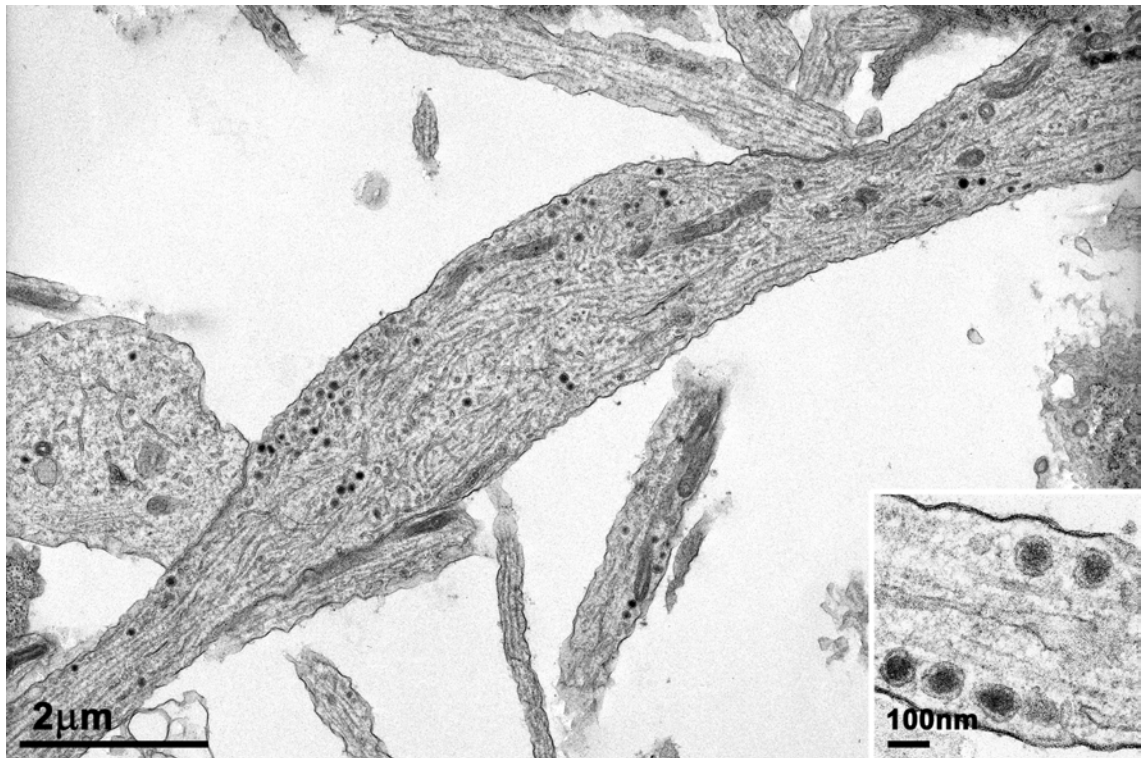


Abb. 25: Nicht infizierte primäre murine Neuronenkulturen aus oberen Zervikalganglien von Rattenembryonen. In den Neuronen finden sich zahlreiche Neurovesikel (kleines Bild).

4.2.3.1 Transport nach Infektion primärer muriner Neuronenkulturen mit PrV-Kaplan

Zur Untersuchung des Transportes von PrV-Kaplan wurden infizierte Neuronenkulturen zu den Zeitpunkten 12, 14, 16 und 18 h p.i. verwendet.

Elektronenmikroskopisch ließen sich in den Neuronen alle Phasen des Replikationszyklus von Herpesviren nachweisen. Im Zellkern fanden sich unterschiedliche Stadien des Zusammenbaus der Nukleokapside. An der inneren Kernmembran konnte die primäre Umhüllung beobachtet werden und im Kernspalt waren primär umhüllte Virionen zu erkennen. Ebenso fanden sich Stadien der Freisetzung aus dem Kernspalt an der äußeren Kernmembran. Im Bereich des Trans-Golgi-Netzwerkes erfolgte durch Knospen die sekundäre Umhüllung, danach fanden sich die reifen Virionen in Vesikeln.

Mittels Elektronenmikroskopie ließen sich nach PrV-Ka-Infektion zwei verschiedene Möglichkeiten der Ausschleusung von reifen Virionen finden. Zum einen wurden die Virionen in Vesikeln entlang der Mikrotubuli zur Zellmembran transportiert und dort durch Fusion der Vesikelmembran mit der Zellmembran entlassen. Eine andere

Möglichkeit war der intraaxonale anterograde Transport. Nach Infektion mit PrV-Ka konnten im Axon umhüllte Virionen in Vesikeln nachgewiesen werden. Die umhüllten Virionen zeichnen sich durch ein Kapsid mit elektronendichtem Nukleoid aus, das von einem Bereich geringerer Elektronendichte umgeben ist und daher grau erscheint. Diese Virionen waren mit den Mikrotubuli assoziiert (Abb. 26).

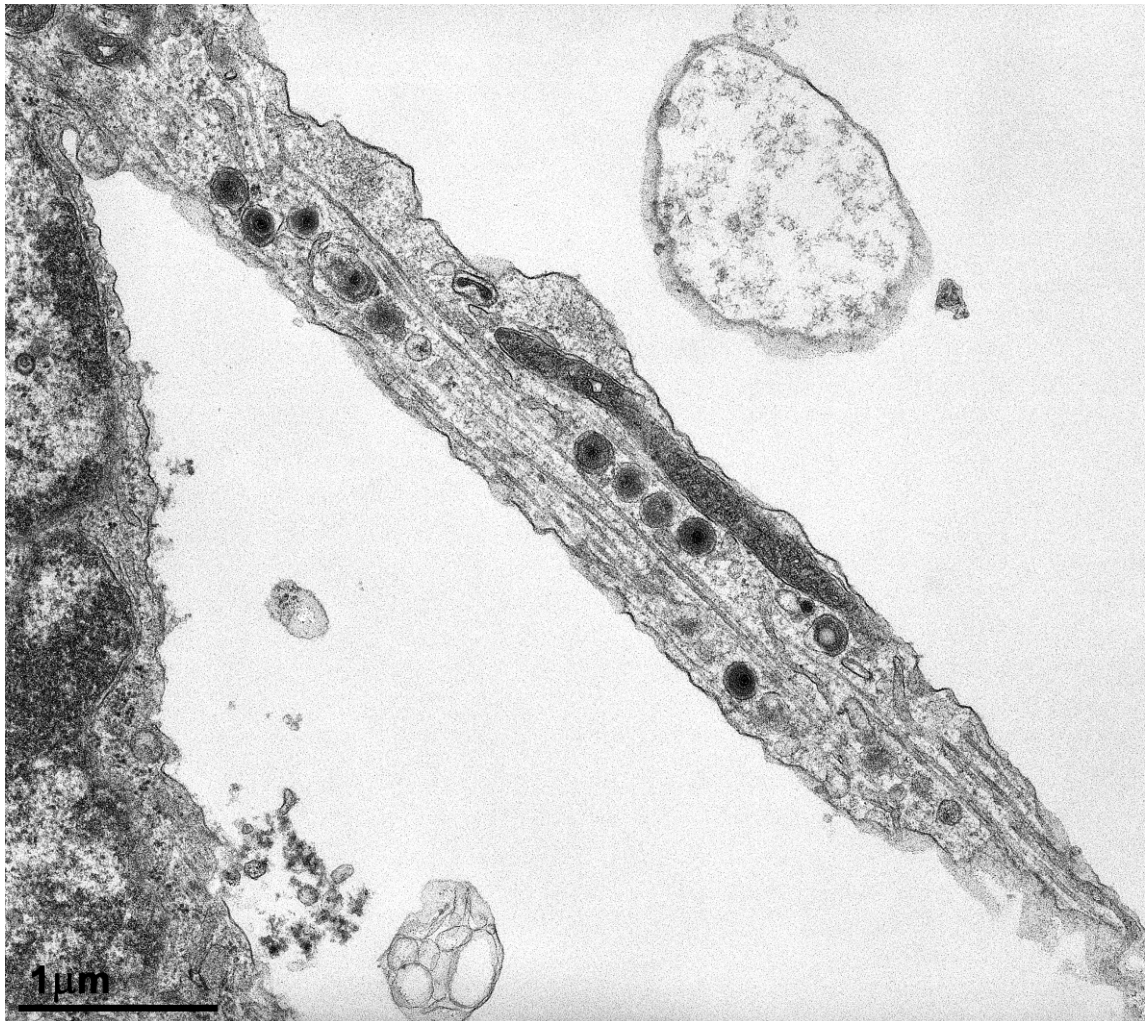


Abb. 26: Axon eines mit PrV-Ka infizierten Neuron. Entlang der Mikrotubuli finden sich perlenschnurartig aufgereiht umhüllte Virionen in Vesikeln.

4.2.3.2 Transport nach Infektion primärer muriner Neuronenkulturen mit PrV-gB⁻

Durch die Verwendung von PrV-gB⁻ konnten in den Axonen anterograd transportierte virushaltige Vesikel identifiziert werden. Das Fehlen des Glykoproteins verhinderte die Reinfektion der Neuronen. Mit PrV-gB⁻ infizierte Neuronen wurden 14 und 18 h p.i.

elektronenmikroskopisch untersucht. Dabei ergab sich das gleiche Bild wie nach PrV-Ka-Infektion. In infizierten Neuronen war es möglich alle Stadien der Virusmorphogenese zu beobachten. In den Axonen fanden sich zahlreiche, in Vesikeln befindliche, umhüllte Virionen. Nicht umhüllte Nukleokapside lagen nur in sehr geringer Zahl vor.

5 Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Neuroinvasion des PrV *in vivo* sowie den axonalen Transport *in vitro* näher zu charakterisieren. Bisherige Untersuchungen zeigten einen Einfluss sowohl von viralen Glykoproteinen als auch von Tegumentproteinen auf die Neuroinvasion und Neurovirulenz (Mettenleiter 2003; Klopffleisch et al. 2006). Aufgrund seiner neurotrophen Eigenschaften kommt dem PrV eine große Bedeutung bei der Erforschung neuronaler Kreisläufe zu. Insbesondere die Unterscheidung zwischen anterograder und retrograder neuronaler Ausbreitung spielt dabei eine wichtige Rolle (Enquist et al. 1998; Diefenbach et al. 2008; Mettenleiter 2008).

Die durch das PrV verursachte Aujeszky'sche Krankheit (AK) tritt sowohl bei Säugern als auch bei Vögeln auf und verläuft, mit Ausnahme beim Schwein, tödlich (Mettenleiter 1994). Alphaherpesviren besitzen die Fähigkeit zur neuronalen Ausbreitung nach einer ersten Replikation in epithelialen Zellen. Im natürlichen Wirt ist das PrV kaum neuroinvasiv, jedoch führt die Infektion in anderen Spezies zu einer ausgeprägten zentralnervösen Ausbreitung, die mit typischen Symptomen einhergeht (Pomeranz et al. 2005).

Seit 2003 sind die Nutztierbestände in Deutschland als AK-frei anerkannt. In einer Langzeitstudie in Nordrhein-Westfalen wurden Wildschweine auf das Vorhandensein von PrV untersucht. Bei 9,4 % der Seren konnten PrV-spezifische Antikörper nachgewiesen werden (Lutz 2009). Infizierte Wildschweine stellen somit mögliche Ansteckungsquellen für andere Tierarten, insbesondere für die Hausschweinpopulation, dar.

Für einen direkten Vergleich der Pathogenese beim **Haus- und Wildschwein** wurden Tiere mit dem hochvirulenten Isolat PrV-NIA3 intranasal infiziert. In beiden Gruppen führte die Infektion zu einem vergleichbaren Krankheitsgeschehen. So konnten bereits ab dem 2. Tag p.i. erste zentralnervöse Symptome mit Bewegungsstörungen beobachtet werden. Der bei anderen empfänglichen Spezies charakteristische Juckreiz wurde nur bei zwei Tieren in geringer Ausprägung beobachtet. Bei allen Tieren führte die Infektion zwischen dem 5. und 7. Tag p.i. zum Tod. Dies stimmt mit Untersuchungen von Pol et al. (1989) überein, bei denen Schweine ebenfalls nach Infektion mit PrV-

NIA3 verstarben. Der Einfluss der Virulenz auf Krankheitsverlauf und Klinik ist für PrV gut bekannt (Gerds et al. 2000). Die Infektion mit dem mittelgradig virulenten PrV-Kaplan hat in Schweinen lediglich respiratorische Symptome zur Folge, nach Infektion mit dem avirulenten Lebendimpfstamm PrV-Bartha konnten keine klinischen Erscheinungen beobachtet werden (Gerds et al. 2000; Pol et al. 1989). Eine Beteiligung des ZNS ist zudem meist nur bei jungen Schweinen zu beobachten (Gerds et al. 2000). Pathomorphologisch fand sich in den vorliegenden Untersuchungen eine Hyperämie der Nasenmuschelschleimhaut, die histopathologisch von epithelialen Nekrosen mit eitrigem Exsudat begleitet war. Immunhistologisch ließen sich bei Haus- und Wildschweinen infizierte Epithelzellen in der Mukosa nachweisen. Das respiratorische Epithel der Nase ist somit eine mögliche primäre Eintrittspforte. Des Weiteren fanden sich jedoch auch in den Tonsillen Nekrosen des Kryptepithels sowie Entzündungszellinfiltrate. PrV-spezifisches Antigen ließ sich mittels immunhistologischer Methoden ebenfalls im Epithel nachweisen. Ebenso konnte PrV-DNA durch In-situ-Hybridisierung und Real-time PCR nachgewiesen werden. Neben einer Funktion der Tonsillen als primäre Replikationsorte, stellen sie auch einen möglichen Latenzort dar (Romero et al. 2003). So konnten bei 80 % latent infizierter Schweine die Latenz-assoziierten Transkripte in den Tonsillen gefunden werden (Cheung 1995).

Die Untersuchungen von Olander und Kollegen (1966) führten zu pathomorphologisch übereinstimmenden Beobachtungen. In ihren Untersuchungen kam es nach intranasaler Infektion zu entzündlichen Reaktionen im Bereich der olfaktorischen Nerven und der frontalen Anteile des Großhirns. Weniger betroffen von der Infektion waren die anderen Anteile des ZNS sowie Rückenmark und Spinalganglien. Bei infizierten Schweinen fand sich eine charakteristische mononukleäre Meningoenzephalitis mit einzelnen neutrophilen Granulozyten.

Sowohl bei Haus- und Wildschweinen konnte eine neuronale Ausbreitung beobachtet werden. Die bereits beschriebenen, charakteristischen Infiltrate waren submeningeal und perivaskulär vorhanden. Deutlich war der Unterschied der betroffenen Strukturen in Groß- und Kleinhirn. Neben den ausgeprägten Infiltraten im Großhirn konnten immunhistologisch jedoch nur einzelne infizierte Neuronen und Gliazellen gefunden werden. Deutlich geringer waren die Infiltrate im Kleinhirn, immunhistologisch gelang dort kein Nachweis infizierter Zellen. Die Diskrepanz zwischen

Entzündungszellinfiltraten und Antigen-positiven Neuronen wurde auch von Gerds et al. (2000) nach Infektion mit einer Wildtyp-ähnlichen Mutante beschrieben.

Es stellt sich die Frage, inwieweit eine Infektion von Neuronen und Gliazellen ursächlich für die auftretenden klinischen Erscheinungen sowie die histomorphologischen Befunde in den Schweinen verantwortlich ist. Die hochgradige reaktive Meningoenzephalitis scheint bei den Tieren für den Tod verantwortlich zu sein.

Die intranasale Infektion von **Mäusen** hatte ebenfalls eine neurogene Ausbreitung von PrV zur Folge. Die Unterschiede in der Virulenz von Wildtypstämmen konnte jedoch nicht beobachtet werden. So führte die intranasale Infektion von PrV-Kaplan und PrV-NIA3 zu vergleichbaren Überlebenszeiten. Bei den Mäusen führte die Infektion zu dem charakteristischen Juckreiz, der insbesondere im Bereich der Inokulationsstelle beobachtet werden konnte. Histomorphologische und immunhistologische Untersuchungen waren mit den Beobachtungen bei Schweinen vergleichbar. Dagegen konnten im ZNS nur sehr wenige infiltrierende Lymphozyten gefunden werden. Immunhistologisch gelang jedoch der Nachweis zahlreicher infizierter Neuronen und Gliazellen in den Ganglien und im Großhirn. So lässt sich vermuten, dass der tödliche Verlauf der AK bei den Mäusen durch die Infektion lebenswichtiger neuronaler Zentren verursacht wird.

Neben der Infektion oronasaler Epithelien sind Alphaherpesviren auch in der Lage, produktive **Infektionen über die Haut** zu beginnen. Goodpasture und Teague (1923) demonstrierten erstmals die Fähigkeit von HSV, sich nach dermalen Inokulation in neuronalem Gewebe auszubreiten. Doch auch für PrV sind Infektionen der Haut beschrieben worden (Ezura et al. 1995). Nach der dermalen Inokulation erfolgte eine erste Ausbreitung im peripheren und später im zentralen Nervensystem.

Die Inokulation von PrV-Kaplan in die rechte Flanke führte in der vorliegenden Arbeit bei den Mäusen zu einem ausgeprägten Juckreiz an der Inokulationsstelle. Die mittlere Überlebenszeit lag bei 91 h p.i. und ist damit im Gegensatz zur intranasalen Infektion deutlich verlängert. Immunhistologisch konnte schon zu frühen Zeitpunkten Antigen nachgewiesen werden. Die neurogene Ausbreitung der Infektion erfolgte über das Rückenmark zum ZNS. Das **Flankenmodell** der Maus wird unter anderem für In-vivo-Untersuchungen des neuronalen Transportes genutzt (Pomeranz et al. 2005; McGraw et al. 2009). Die Infektion der Haut hat eine Ausbreitung in sensorischen Nervenfasern zur

Folge. In diesen erfolgt der retrograde Transport zu den Spinalganglien. Anterograd kann es zu einer erneuten Infektion der Epidermis kommen. In anterograder Richtung erfolgt ebenfalls der Transport von Viruspartikeln zum Dorsalhorn des Rückenmarks und von dort zu transsynaptisch verbundenen Neuronen (McGraw et al. 2009).

Neben den bereits genannten Faktoren, ist es jedoch auch möglich, dass der Hormonstatus einen Einfluß auf den Infektionsverlauf besitzt. Horváth und Kollegen (2002) untersuchten den Einfluss von Östrogen bei der PrV-Infektion. In ihren Untersuchungen mit männlichen, weiblichen und weiblich-kastrierten Ratten fanden sich unterschiedliche infizierte Strukturen im ZNS in Abhängigkeit des Östrogenspiegels. So wurden nach PrV-Inokulation der *Nucleus infundibularis* sowie das *Organum subfornicale* näher untersucht. Dabei konnte in den weiblich-kastrierten Ratten, im Gegensatz zu den weiblichen Tieren, in den genannten Bereichen eine PrV-Infektion nicht nachgewiesen werden.

Einen derartigen hormonellen Einfluss auf den Verlauf der PrV-Infektion in Mäusen lässt sich auch in unseren Untersuchungen nach intranasaler Inokulation von **PrV-ΔUL21/US3** vermuten. So wichen die klinischen Erscheinungen stark von den bisher nach Infektion mit PrV-Kaplan beobachteten Symptomen ab. Die Inkubationszeit war deutlich länger und in männlichen und weiblichen Tieren gab es ausgeprägte Unterschiede in den klinischen Erscheinungen. Bei den männlichen Mäusen zeigten sich hochgradige klinische Erscheinungen sowie eine höhere Letalität. Die Erscheinungen bei den weiblichen Mäusen und die Letalitätsrate waren hingegen deutlich geringer. In den Untersuchungen von Weiss et al. (2001) fand sich ein Einfluss des Östrogens auf die Ausbreitung von PrV innerhalb des ZNS. Demgegenüber konnten Lee und Erskine (2000) in ihren Untersuchungen keine Veränderung der Infektiosität nach Östrogenbehandlung nachweisen. Jedoch lassen auch unsere Untersuchungen einen Effekt des Hormonstatus auf den Krankheitsverlauf vermuten. Immunhistologisch konnten 24 h p.i. infizierte Epithelzellen im Rachenbereich und bereits 48 h p.i. infizierte Neuronen erster Ordnung nachgewiesen werden. Die Infektion von Neuronen im Stammhirn fand 120 h p.i. statt, infizierte kortikale Neuronen konnten mit Einsetzen der ersten klinischen Erscheinungen ab 192 h p.i. gefunden werden. Damit zeigte sich eine stark verzögerte Neuroinvasion im Vergleich zu PrV-Ka. Auffallend war die geringe Zahl infizierter Neuronen erster und zweiter Ordnung. Demgegenüber waren

bei erkrankten Tieren zahlreiche kortikale Neuronen infiziert. Ähnlich wie bei den Schweinen, jedoch im Unterschied zu anderen PrV-Infektionen bei Mäusen, war eine hochgradige Meningoenzephalitis nachweisbar. Mit diesen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass beide Proteine offenbar eine wichtige Rolle bei der Neuroinvasion spielen.

Für die In-vitro-Untersuchungen von PrV- Δ UL21/US3 in primären Neuronenkulturen erfolgte die Fusion des pUL35 mit dem Fluoreszenzprotein mCherry.

Die Untersuchung des retrograden Transportes ergab keine Abweichungen zu PrV-Ka. Der Verlust der Proteine pUL21 und pUS3 hat somit keine Veränderung beim Eintritt in die Zelle und beim Transport zum Zellkern zur Folge. Für die Untersuchungen des anterograden Transportes wurden die neuronalen Zellkulturen erstmals 24 h nach Infektion untersucht. Zu diesem Zeitpunkt konnten Degenerationserscheinungen in Form von Abkugeln und Ablösen von der Petrischale beobachtet werden. Es waren zwar eine große Anzahl der Neuronen infiziert, jedoch fand in den Axonen kein anterograde Transport statt. Nun kann vermutet werden, dass der Zeitpunkt für die Untersuchungen zu spät gewählt war. Deshalb wurden Neuronenkulturen beginnend ab 4 h nach Infektion untersucht, um zu einem früheren Zeitpunkt Transportvorgänge messen zu können. Im zeitlichen Verlauf zeigte sich zwar eine Zunahme der Infektion, jedoch war es auch hier nicht möglich, anterograd transportierte Kapside zu beobachten. Schlussfolgernd lässt sich also sagen, dass die simultane Deletion von pUL21 und pUS3 einen Einfluss auf anterograde Transportprozesse besitzt.

Die virale Kinase **pUS3** beeinflusst das Aktinskelett der Zelle (Van den Broeke et al. 2009). Sie induziert Änderungen im Zytoskelett und führt so zu aktin- und mikrotubulihaltigen Ausläufern. Dadurch kann eine leichtere Zell-zu-Zell-Ausbreitung der Viruspartikel erfolgen (Favoreel et al. 2005). Dies könnte in den Untersuchungen die verzögerte Neuroinvasion in den Mäusen erklären.

pUL21 ist ein nicht essentielles Protein, das an der Reifung der Viruspartikel beteiligt ist (Klupp et al. 1995). In den Untersuchungen von Klupp et al. konnte pUL21 als ein virulenzbestimmender Faktor identifiziert werden. Die vergleichende Infektion von juvenilen Schweinen ergab nach Infektion mit PrV-Ka eine Letalität von 100 %, wohingegen die Deletion von UL21 in den Schweinen zu einem völligen Ausbleiben

klinischer Erscheinungen führte. In Studien von Wagenaar et al. (2001) fanden sich nach Infektion mit pUL21-Deletionsmutanten elektronenmikroskopisch zahlreiche DNA-freie Kapside im Zytoplasma. Dies weist auf eine Beteiligung des Proteins bei der Verpackung der DNA hin.

Der nach Infektion mit PrV- Δ UL21/US3 beobachtete Phänotyp wird nach intranasaler Inokulation der Einzelmутanten nicht beobachtet. Vergleichbar mit PrV- Δ US3 tritt nach Infektion mit PrV- Δ UL21 zwar eine geringgradige Verzögerung der Virusausbreitung in den Mäusen auf, jedoch ist der Verlauf weitgehend mit PrV-Ka vergleichbar. Somit scheint *in vivo* ein synergistischer Effekt der beiden Proteine vorzuliegen.

Ein wesentlicher Aspekt der Neuroinvasion ist die Fähigkeit des PrV zum intraaxonalen Transport und zur transneuronalen Ausbreitung. Damit spielt PrV bei der Erforschung neuronaler Kreisläufe eine wichtige Rolle (Card und Enquist 2001; Song et al. 2005; Ekstrand et al. 2008; Granstedt et al. 2009). *In vivo* wird das Modell der intranasalen Inokulation von Mäusen sowie die intraokuläre Inokulation von Mäusen und Ratten zur Charakterisierung der Neuroinvasion und Neurovirulenz verwendet (Klopfleisch et al. 2004; Pomeranz et al. 2005). *In vitro* erfolgen die Untersuchungen zum intraaxonalen Transport und zur transneuronalen Ausbreitung in neuronalen Zellkulturen (Ch'ng und Enquist 2006). **Neuronen** sind polare Zellen, deren Axone zum Teil lange Ausläufer bilden. Untersuchungen an Adeno- und Herpesviren haben mittlere intraaxonale Transportgeschwindigkeiten von 0,58-2,60 $\mu\text{m/s}$ ergeben (Sodeik 2000). Dieser schnelle axonale Transport kann nicht durch Diffusion erfolgen, sondern wird durch zelluläre Motorproteine, wie Dynein und Kinesin vermittelt (Sodeik 2000; Döhner et al 2006). Die intraaxonale Ausbreitung erfolgt retrograd von der Synapse zum Minusende am Zellkern und in anterograder Richtung vom Zellkern zum Plusende der Mikrotubuli an der Synapse. Bei HSV lagen die Geschwindigkeiten für den retrograden Transport bei 3-5 mm/h und anterograd bei 2-3 mm/h (Lycke et al. 1984).

Für In-vitro- und In-vivo-Untersuchungen erfolgt die Fusion viraler Proteine mit Fluoreszenzproteinen (Antinone et al. 2006; Desai und Person 1998; Smith et al. 2001 und 2004; Snyder et al. 2006; Wolfstein et al. 2006). Das bekannteste Fluoreszenzprotein ist das „Grün fluoreszierende Protein“ (GFP) aus der Qualle *Aequorea victoria*. Bei Anregung mit ultravioletterem oder blauem Licht erfolgt die

Emission von grüner Fluoreszenz bei einer Wellenlänge von 509 nm (Desai und Person 1998). Mittlerweile gibt es neben Varianten des GFP, wie dem EGFP mit einer 35fach stärkeren Fluoreszenz, auch zahlreiche weitere Fluoreszenzproteine, wie beispielsweise das rot fluoreszierende mCherry oder das gelb fluoreszierende YFP („yellow fluorescent protein“; Shaner et al. 2005; Seefeldt et al. 2008; Graewe et al. 2009; Wu et al. 2009). Um den Einfluß der Fusion von GFP mit dem Kapsidprotein pUL35 auf die Neuroinvasion zu untersuchen, wurden Mäuse vergleichend mit PrV- Δ UL35 und PrV-UL35GFP intranasal infiziert. Für das murine und humane Cytomegalievirus wurden nichtfunktionale Fusionen von EGFP mit pUL35-homologen Proteinen beschrieben (Borst et al. 2001).

Die Infektion mit **PrV- Δ UL35** ergab eine mittlere Überlebenszeit von 70 h p.i. in den Mäusen. Vergleichend mit PrV-Ka fanden sich 24 h p.i. erste infizierte Epithelzellen in der Nase und 48 h p.i. bereits infizierte Neuronen erster und zweiter Ordnung. So konnte gezeigt werden, dass die Deletion von pUL35 zu einer schwachen Attenuierung hinsichtlich der Neurovirulenz gegenüber dem Wildtyp führte. Diese Beobachtungen stimmen mit den Untersuchungen von Desai et al. (1998) bei HSV-1 überein. Die intranasale Inokulation von **PrV-UL35GFP** führte in unseren Untersuchungen zu einer mittleren Überlebenszeit von 72 h p.i. Klinische Erscheinungen und histopathologische und immunhistologische Untersuchungen ergaben für PrV- Δ UL35 und PrV-UL35GFP vergleichbare Resultate. Damit verhielt sich die Fusion von pUL35 mit GFP funktional *in vivo* wie die Deletion des Proteins. Dies konnte auch in In-vitro-Untersuchungen von Krautwald und Kollegen (2008) gezeigt werden. Somit muss beachtet werden, dass die Fusion von Fluoreszenzproteinen mit pUL35 offenbar einen Funktionsverlust des Proteins zur Folge hat. Im Replikationszyklus benötigt pUL35 die Interaktion mit pUL19 für den Eintritt in den Zellkern (Rixon et al. 1996; Ward et al. 1996). Es ist jedoch nicht essentiell für den Zusammenbau der Viruspartikel (Tatman et al. 1994; Trus et al. 1995; Desai et al. 1998). Eine mögliche Funktion ist die Interaktion von pUL35 mit Dynein und Dynactin (Antinone et al. 2006). Untersuchungen mit HSV-1 belegen eine Interaktion dieses Proteins mit Tctex1 und rp3, zwei Bestandteilen der leichten Kette von Dynein. So konnte bei Fehlen von pUL35 kein retrograder Transport in Axonen beobachtet werden (Douglas et al. 2004). Demgegenüber wurde in nichtpolaren Zellen auch bei Abwesenheit von UL35 ein Transport zum Zellkern nachgewiesen (Döhner et al. 2006).

Mögliche weitere Kandidaten für die Interaktion mit Dynein und Dynactin sind im Bereich des äußeren Kapsids bzw. des inneren Teguments zu suchen (Diefenbach et al. 2008). Antinone et al. (2006) konnten in ihren Untersuchungen jedoch zeigen, dass die meisten am Kapsid verbleibenden Tegumentproteine für den intraaxonalen Transport nicht von Bedeutung sind.

In der vorliegenden Arbeit wurden für die Charakterisierung des intraaxonalen Transportes von PrV primäre murine Neuronenkulturen aus oberen Zervikalganglien von Rattenembryonen verwendet.

Nach Infektion mit PrV-Kaplan konnte eine mittlere retrograde Geschwindigkeit von 0,59 $\mu\text{m/s}$ ermittelt werden. Die Transportgeschwindigkeiten der einzelnen Kapside variierten zwischen 1,0 und 0,3 $\mu\text{m/s}$. Smith et al. (2004) beschrieben eine mittlere retrograde Geschwindigkeit von 1,17 $\mu\text{m/s}$ nach Infektion von aviären Neuronenkulturen aus Spinalganglien mit dem Wildtypstamm PrV-Becker. Diese beiden unterschiedlichen Geschwindigkeiten führen zu der Annahme, dass neben stammspezifischen Eigenschaften auch zelluläre Faktoren eine wesentliche Rolle beim axonalen Transport spielen könnten.

In PrV-infizierten Neuronenkulturen konnte bei allen untersuchten Viren ein bidirektionaler Kapsidtransport beobachtet werden. Diese Ergebnisse werden durch Untersuchungen mit HSV-1 gestützt (Diefenbach et al. 2008).

Bei HSV-1 wurden durch verschiedene Arbeitsgruppen weitere mögliche Interaktionspartner mit Dynein ermittelt. So bindet pUL34 von HSV-1 an das N-terminale Fragment der leichten Kette von Dynein (Ye et al. 2000). Eine Deletion von pUL34 führte jedoch nicht zur Verhinderung der Infektion (Roller et al. 2000). Bei PrV ist pUL34 in reifen Virionen nicht vorhanden und damit beim retrograden Transport nicht von Bedeutung (Fuchs et al. 2002b; Klupp et al. 2000 und 2001). Weitere mögliche Interaktionspartner für den retrograden Transport von HSV-1 sind pUL36 und pUL25. Beide Proteine verbleiben während des Transportes am Kapsid und stellen somit ideale Kandidaten für die Interaktion mit zellulären Motorproteinen dar (Döhner et al. 2002; Tomishima et al. 2001). Beim retrograden Transport von PrV könnten neben pUL36 auch pUL37 und pUS3 eine Rolle spielen (Granzow et al. 2005; Luxton et al. 2005). In-vivo-Untersuchungen konnten jedoch bislang keine Interaktion mit Dynein und Dynactin belegen (Douglas et al. 2004).

Das Tegumentprotein **pUL37** befindet sich im Viruspartikel in unmittelbarer Nachbarschaft zum Kapsid (Fuchs et al. 2004). Im Replikationszyklus von HSV-1 besitzt pUL37 eine essentielle Bedeutung (Desai et al. 2001). Bei PrV dagegen erfolgt *in vitro* auch ohne Beteiligung von pUL37 die Bildung infektiöser Nachkommen (Klupp et al. 2001). Untersuchungen in der Maus konnten jedoch die essentielle Funktion dieses Proteins *in vivo* zeigen (Klopffleisch et al. 2006). Dies konnte in diesen Untersuchungen bestätigt werden. Die intranasale Inokulation der pUL37-Deletionsmutante führte im gesamten Beobachtungszeitraum zu keinen klinischen Symptomen.

Durch In-vitro-Untersuchungen konnte in der neuronalen Zellkultur trotz Fehlen von pUL37 intraaxonaler retrograder Transport der Kapside nachgewiesen werden. Die gemessene mittlere retrograde Geschwindigkeit lag bei 0,93 $\mu\text{m/s}$. Dies zeigt, dass pUL37 für den retrograden Transport in Neuronen *in vitro* nicht von Bedeutung ist. Krautwald et al. (2009) konnten in ihren Untersuchungen in nichtpolaren Zellen jedoch eine Verzögerung um 1-2 h beim retrograden Transport im Vergleich zum Wildtyp feststellen. pUL37 scheint damit kein direkter Interaktionspartner für Dynein bzw. Dynactin zu sein, jedoch kommt es beim Fehlen des Proteins zu einem verlangsamten Transport der Viruspartikel zum Zellkern.

Eine weitere Bedeutung besitzt pUL37 beim anterograden Transport. So konnte 24 h p.i. in den Axonen keinen anterograden Kapsidtransport nachgewiesen werden. Damit stellt pUL37 einen möglichen Interaktionspartner für Kinesin dar. Diese Funktion könnte die fehlende Neuroinvasion in den Mäusen erklären.

Bei PrV, HSV-1 und HCMV interagiert pUL37 mit **pUL36** (Klupp et al. 2002; Mijatov et al. 2007; Vittone et al. 2005; Bechtel und Shenk 2002). Die Deletion von pUL36 führte bei PrV und HSV-1 zu einer Blockierung der Virusmorphogenese im Zytoplasma. Sowohl die Replikation im Zellkern als auch die Freisetzung primärer Kapside aus dem Zellkern waren hingegen nicht beeinträchtigt (Desai 2000; Fuchs et al. 2004).

In den vorliegenden Untersuchungen konnte nach intranasaler Inokulation einer pUL36-Deletionsmutante in Mäusen immunhistologisch kein Virusantigen nachgewiesen werden. Damit bestätigte sich *in vivo* die bereits *in vitro* festgestellte essentielle Bedeutung des Proteins.

Das UL36-Protein besitzt ein Molekulargewicht von 324 kDa und wird als „large tegument protein“ bezeichnet. Bislang konnte seine Funktion im Replikationszyklus nicht eindeutig aufgeklärt werden (Klupp et al. 2002). Die Identifizierung und Charakterisierung funktioneller Domänen innerhalb des Proteins erfolgte sowohl bei HSV-1 als auch bei PrV (Kattenhorn et al. 2005; Böttcher et al. 2006, 2007 und 2008). Die Identifizierung einer Deubiquitinierungsaktivität im HSV-1 pUL36 erfolgte mittels biochemischer Untersuchungen (Kattenhorn et al. 2005). Die Ubiquitinierung ist eine reversible posttranslationale Modifizierung, bislang ist die Bedeutung der herpesviralen Deubiquitinierungsdomäne jedoch noch unklar. Durch Sequenz-Analyse-Programme wurden zwei putative Leucin-Zipper-Motive identifiziert, die für Interaktionen mit viralen und zellulären Proteinen bedeutsam sein können (McNabb und Courtney 1992; Klupp et al. 2002).

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die In-vivo-Charakterisierung einzelner UL36-Mutanten, die Deletionen im N- oder C-terminalen Bereich des Proteins aufwiesen. Die intranasale Inokulation von PrV-UL36 Δ 2087-2795 führte zu einer mittleren Überlebenszeit von ca. 65 h p.i. und phänotypisch zu einer mit PrV-Kaplan vergleichbaren Ausprägung. Dies stimmt mit Untersuchungen von Böttcher et al. (2007) überein, die *in vitro* nur eine geringe Attenuierung gegenüber dem Wildtyp ermitteln konnten. Auffallend hingegen war der Phänotyp nach Infektion mit PrV-UL36 Δ 2087-2981. Diese Mutante besitzt eine Deletion im C-terminalen Bereich des UL36-Proteins und zeigte in der In-vitro-Charakterisierung nur geringe Unterschiede zu PrV-Kaplan (Böttcher et al. 2007). In den Mäusen konnte jedoch eine deutlich verlängerte Überlebenszeit von 90 h p.i. beobachtet werden. Damit weicht der In-vivo-Phänotyp deutlich von den Untersuchungen in der Zellkultur ab. Dies deutet auf eine wichtige Funktion dieses Bereiches bei der Neuroinvasion hin. Interessant ist jedoch die Tatsache, dass es möglich ist, 895 Aminosäuren aus diesem essentiellen Protein zu entfernen, ohne dass die Funktion drastisch eingeschränkt ist.

Die **Deubiquitinierungsdomäne** befindet sich in der N-terminalen Region des Proteins. Nach Deletion dieses Bereiches (PrV-UL36 Δ 22-248) zeigte sich *in vivo* eine nur gering verlängerte Überlebenszeit von 74 h p.i. im Vergleich zum Wildtyp. Auch die Ausbreitung entsprach den Ergebnissen nach Infektion mit PrV-Kaplan. Böttcher et al. (2007) konnten in Zellkultur sowie in elektronenmikroskopischen Untersuchungen keine starken Abweichungen zum Wildtyp nachweisen. Diese Ergebnisse korrelieren

mit Untersuchungen mit dem humanen Cytomegalovirus (HCMV), widersprechen jedoch anderen Beobachtungen in PrV (Lee et al. 2006; Wang et al. 2006). Die Deletion der Aminosäuren 6-225 im N-terminalen Bereich von pUL36 führte *in vitro* zu einer deutlich geringeren Ausbreitung in Zellkultur sowie zu einem 1000fach geringerem Titer. Des Weiteren fand sich eine Beeinflussung der Funktion von pUL37 (Lee et al. 2006). Lee und Kollegen konnten mittels konfokaler Laser-Scan-Mikroskopie beim retrograden Transport keine Unterschiede zum Wildtyp feststellen, vermuteten jedoch einen Defekt bei der Freisetzung. Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen deuten dagegen nicht auf eine veränderte Neuroinvasion nach Deletion von 227 Aminosäuren im N-Terminus hin. Es stellt sich damit die Frage, ob der bei Lee et al. (2006) beobachtete Phänotyp durch die Deletion der Aminosäuren 6-22 im N-Terminus entstanden ist.

Deubiquitinierung erfolgt durch hydrolytische Enzyme, deren katalytisches Zentrum bei allen Herpesviren konserviert ist. Als aktives Zentrum wurde ein Cystein an der Position 26 im UL36-Protein identifiziert (Schlieker et al. 2007; Böttcher et al. 2008). Durch Austausch des aktiven Cysteins gegen ein Serin wurde eine Mutante generiert, die eine genaue Untersuchung des aktiven Zentrums ermöglichte (Böttcher et al. 2008). Nach intranasaler Inokulation von PrV-UL36(C₂₆S) überlebten die Mäusen bis 117 h p.i. und damit doppelt so lang wie nach Wildtypvirusinfektion. Die Ergebnisse der immunhistologischen Untersuchung spiegeln dies ebenfalls wider. Die Infektion primärer Neuronen erfolgte erst 72 h p.i. und damit 48 h später als beim Wildtyp. Der Austausch nur einer Aminosäure hat einen deutlich stärkeren Phänotyp zur Folge als die Deletion des gesamten Bereiches. An welchem Prozess im Replikationszyklus ist nun dieser funktionelle Bereich des pUL36 von Bedeutung? In primären Neuronen erfolgte die Untersuchung von PrV-UL36(C₂₆S)/UL35GFP. Die Messung des intraaxonalen anterograden Transportes erfolgte 24 h p.i. und ergab eine Durchschnittsgeschwindigkeit von 0,5 µm/s. Der Austausch der Aminosäure hatte somit keinen Einfluss auf den anterograden Kapsidtransport.

Im inneren Tegument des Viruspartikels finden sich die beiden Proteinkinasen **pUS3** und **pUL13**, die beim gerichteten Transport zum und vom Zellkern von Bedeutung sein könnten. Studien zur Neurovirulenz bei Abwesenheit von pUS3 wurden sowohl für HSV-1 und -2 als auch für PrV durchgeführt (Meignier et al. 1988; Nishiyama et al.

1992; Kurachi et al. 1993; Asano et al. 2000; Geenen et al. 2005). Olsen und Kollegen (2006) untersuchten den Einfluss von PrV- Δ US3 bei der neuronalen Infektion. Die intraokuläre Infektion mit der US3-Deletionsmutante führte zu einer durchschnittlichen Überlebenszeit von 80 h p.i. im Vergleich zur Infektion mit dem Wildtyp PrV-Becker mit 66 h p.i. Diese leicht verzögerte Neurovirulenz wird durch einen geringen Replikationsdefekt sowie einem verzögerten retrograden Transport begründet. Untersuchungen ergaben eine mittlere Überlebenszeit von 56 h p.i. nach Infektion mit PrV- Δ US3, was keine wesentliche Verzögerung im Vergleich zum Wildtyp darstellt (Klopfleisch et al. 2006). Für den retrograden Transport scheint damit auch pUS3 nicht essentiell zu sein. Nun ist es möglich, dass die Funktion von pUS3 bei der Aktivierung von Dynein und Kinesin durch pUL13 übernommen wird. Die durchschnittliche Überlebenszeit, die nach intranasaler Infektion der Doppeldeletionsmutante PrV- Δ UL13F/US3 ermittelt werden konnte, lag bei 72 h p.i. Damit verläuft die Neuroinvasion leicht verzögert ab, jedoch kommt es in den Mäusen immer noch zu einer tödlich verlaufenden Infektion. Dies zeigt, dass die Funktion beider Kinasen *in vivo* nicht essentiell ist.

Der Replikation viraler DNA im Zellkern folgen die primäre Umhüllung und der Austritt in den Kernspalt (Mettenleiter 2004 und 2006). Am Trans-Golgi-Netzwerk kommt es zur sekundären Umhüllung (Mettenleiter 2002). Im Anschluss erfolgen der Transport zur Zellmembran sowie die Freisetzung der reifen Viruspartikel. Der anterograde Transport entlang der Mikrotubuli wird durch Motorproteine der Kinesin-Superfamilie vermittelt (Goldstein und Yang 2000; Hirokawa und Takemura 2004 und 2005; Radtke et al. 2006). Die Freisetzung in nichtpolaren Zellen erfolgt an der Zellmembran mittels Exozytose (Granzow et al. 1997). Bisher konnten die am anterograden Transport beteiligten Kinesine nicht eindeutig identifiziert werden. Von viraler Seite wird jedoch pUL36 für den anterograden Transport in nicht-neuronalen Zellen benötigt (Luxton et al. 2006). Eine mögliche Interaktion des pUL36 mit Kinesin könnte über das KIF5b-bindende Protein p180 erfolgen (Ogawa-Goto et al. 2002; Diefenbach et al. 2004; Luxton et al. 2006).

Die Freisetzung der Viruspartikel aus neuronalen Zellen kann über zwei Wege erfolgen. Zum einen werden ebenso wie in nichtpolaren Zellen Viruspartikel zur Zellmembran im Bereich des Perikaryons transportiert und dort über Exozytose freigesetzt. Des Weiteren

findet jedoch auch ein intraaxonaler Transport und die Freisetzung durch Exozytose an der Synapse bzw. in Zellkultur am Wachstumskegel statt (Diefenbach et al. 2008).

Der **intraaxonale anterograde Transport** von Herpesviren wird derzeit kontrovers diskutiert und zwei verschiedene Modelle werden propagiert. Untersuchungen an HSV-1 gehen von einem getrennten Transport viraler Kapside und Glykoproteine aus. Diese Theorie wird als „subassembly model“ bezeichnet und durch Untersuchungen verschiedener Arbeitsgruppen gestützt (Penfold et al. 1994; Holland et al. 1999; Miranda-Saksena et al. 2000; Ohara et al. 2000 und 2001; Tomishima und Enquist 2001; Enquist et al. 2002; Tomishima und Enquist 2002; LaVail et al. 2003, 2005 und 2007; Saksena et al. 2006; Snyder et al. 2007). Das alternative Modell wird als „married model“ bezeichnet und beinhaltet den Transport vollständig umhüllter Viruspartikel (Ch'ng und Enquist 2005a; del Rio et al. 2005).

Die Untersuchungen zum anterograden Transport des PrV wurden an primären murinen Neuronenkulturen durchgeführt. Zu unterschiedlichen Zeiten nach der Infektion wurden die Neuronen elektronenmikroskopisch untersucht. In den neuronalen Zellen verlief der Replikationszyklus vergleichbar zu nichtneuronalen Zellen ab. Wie bei Diefenbach et al. (2008) beschrieben, erfolgte die Freisetzung der Viruspartikel zum Teil an der Zellmembran im Bereich des Perikaryons durch Exozytose. Des Weiteren konnten intraaxonale Viruspartikel entlang der Mikrotubuli identifiziert werden. Die ultrastrukturellen Untersuchungen zeigten vollständig umhüllte Viruspartikel innerhalb von Vesikeln. Um einen retrograden Transport ausschließen zu können, wurden weitere Untersuchungen mit PrV-gB⁻ durchgeführt. Durch Anzucht auf einer gB-komplementierenden Zelllinie war diese Virusmutante in der Lage, Neuronen einmalig zu infizieren. Die neu gebildeten Viruspartikel enthielten jedoch das für die Penetration essentielle gB nicht mehr und waren so nach der Freisetzung nicht mehr infektiös. Die ultrastrukturellen Untersuchungen nach Infektion mit PrV-gB⁻ ergaben die gleichen Ergebnisse wie bei PrV-Kaplan. Damit konnten wir ultrastrukturell eindeutig den Transport vollständig umhüllter PrV-Partikel nachweisen. Diese Untersuchungen stützen die Ergebnisse von anderen Arbeitsgruppen zum anterograden Transport des PrV. Del Rio et al. (2005) nutzten für ihre Untersuchungen doppelt markierte PrV-Partikel. Dazu erfolgte die Fusion des Kapsidproteins pUL35 mit mRFP und des Tegumentproteins pUL49 mit GFP. Die Kolokalisation beider Fluoreszenzen in den

Axonen stützen die Theorie des gemeinsamen Transportes von Kapsid und Tegument. Die Untersuchungen von Ch'ng und Enquist (2005b) im Drei-Kammer-Modell ergaben umhüllte intraaxonale Viruspartikel in Vesikeln. Dabei nutzten sie das mittlere Kompartiment aufgrund der hohen Dichte an Axonen für elektronenmikroskopische Untersuchungen. Die Verwendung des Drei-Kammer-Modells erlaubte ihnen die exakte Identifizierung der Transportrichtung. Neuere Untersuchungen mit fluoreszenzmarkierten Viruspartikeln zeigten ebenfalls den gemeinsamen Transport viraler Glykoproteine mit dem Kapsid (Antinone und Smith 2006).

Demgegenüber stehen zahlreiche Untersuchungen zum anterograden Transport von HSV-1. Untersuchungen mit der konfokalen Laser-Scan-Mikroskopie, der Transmissionselektronenmikroskopie und der Nutzung von Nocodazol zur Hemmung der Mikrotubulibildung zeigten einen intraaxonalen anterograden Transport nichtumhüllter Kapside (Penfold et al. 1994). In weiteren elektronenmikroskopischen Untersuchungen fand sich nach Immunmarkierung ein gemeinsamer Transport der Kapside mit pUL48, jedoch getrennt von Glykoproteinen (Holland et al. 1999). Weitere In-vitro-Untersuchungen kamen für HSV-1 ebenfalls zum Ergebnis des getrennten anterograden Transportes von Kapsid und Glykoproteinen innerhalb von Vesikeln (Miranda-Saksena et al. 2000; LaVail et al. 2003, 2005 und 2007).

Diese Untersuchungen weisen auf einen unterschiedlichen Transportmechanismus für den intraaxonalen anterograden Transport bei PrV und HSV hin. Beide Viren besitzen nur eine 30 %ige Homologie ihrer Proteine (Klupp et al. 2001 und 2002; Kopp et al. 2003). Diese Unterschiede in der Proteinzusammensetzung könnten für die voneinander abweichenden Transportmechanismen verantwortlich sein. Zudem ist es schwer, die Ergebnisse der einzelnen Gruppen miteinander zu vergleichen, da es große Unterschiede in den Untersuchungszeitpunkten und den verwendeten Untersuchungsmethoden und Neuronenkulturen gibt. Trotz des unterschiedlichen anterograden Transportes muss aber sowohl bei HSV-1 als auch bei PrV eine Interaktion viraler Proteine mit zellulären Motorproteinen stattfinden.

Hinsichtlich der Geschwindigkeit konnten in der vorliegenden Arbeit bei der Messung des anterograden Transportes keine Unterschiede zum retrograden Transport gefunden werden. Die durchschnittlichen Transportgeschwindigkeiten lagen zwischen 0,35 und 1,0 $\mu\text{m/s}$.

Die genauen Mechanismen sind bislang unklar, zahlreiche Untersuchungen weisen jedoch auf eine Beteiligung von **pUS9**, **gE** und **gI** beim anterograden intraaxonalen Transport und bei der anterograden Ausbreitung hin (Card et al. 1992; Whealy et al. 1993; Babic et al. 1996; Brideau et al. 2000; Chowdhury et al. 2002; Brittle et al. 2004; Ch'ng und Enquist 2005a; Polcicova et al. 2005; Wang et al. 2005; Butchi et al. 2007; La Vail et al. 2007; Lyman et al. 2007 und 2008). So führte die Deletion eines der drei Gene zu einer reduzierten Ausbreitung der Infektion von infizierten präsynaptischen zu nichtinfizierten postsynaptischen Neuronen (Brideau et al. 2000; Ch'ng und Enquist 2005a).

pUS9 von PrV ist ein Membranprotein, dessen Konzentration intrazellulär in der Nähe des Trans-Golgi-Netzwerkes am höchsten ist (Brideau et al. 1998). In einer bovinen Nierenzelllinie führte die Deletion von pUS9 zu keiner Änderung der Zell-zu-Zell-Ausbreitung von PrV (Brideau et al. 2000). In-vivo-Untersuchungen deuten jedoch auf eine Neuronen-spezifische Funktion des Proteins hin (Ch'ng und Enquist 2005b). So wurde ursprünglich eine Beteiligung von pUS9 beim axonalen Transport von viralen Glykoproteinen, nicht jedoch von Kapsid und Tegument beschrieben (Tomishima und Enquist 2001). Neuere Untersuchungen zeigten jedoch auch die Beteiligung von pUS9 am axonalen Kapsidtransport. In den Untersuchungen von Lyman et al. (2007) konnten 24 h nach Infektion von Neuronenkulturen mit PrV-Becker infizierte Neuronen zweiter Ordnung gefunden werden. Die Infektion mit einer pUS9-Deletionsmutante führte im gleichen Zeitraum zwar zu infizierten Neuronen erster Ordnung, eine Infektion der synaptisch verbundenen Neuronen hatte jedoch nicht stattgefunden. Ebenso konnte mittels konfokaler Laser-Scan-Mikroskopie kein anterograder Transport nachgewiesen werden.

In den vorliegenden Untersuchungen zur anterograden Ausbreitung in neuronalen Zellen nach Deletion von pUS9 konnten 24 h p.i. ebenfalls keine anterograden Transportprozesse nachgewiesen werden. Nach weiteren 24 h fanden sich jedoch zahlreiche anterograd transportierte Kapside in den Axonen. Dies entspricht den Untersuchungen im Tier, wo die Deletion des Proteins zu einer verzögerten, jedoch immer noch stattfindenden Neuroinvasion führt. Dies zeigt, dass pUS9 für den anterograden intraaxonalen Transport nicht essentiell ist. Ebenso führte die Deletion von **gE** in den vorliegenden Untersuchungen nicht zu einer Blockierung des anterograden intraaxonalen Transportes. Für die Untersuchungen zur transneuronalen Ausbreitung von Herpesviren und für die Identifizierung neuronaler Kreisläufe wird

häufig **PrV-Bartha** genutzt (Card et al. 1990 und 1991; Babic et al. 1996; Banfield et al. 1998; Brideau et al. 2000). Durch Deletionen im Bereich der Glykoproteine gE und gI, sowie von pUS9 und Teilen von pUS2 findet *in vivo* nur eine retrograde Ausbreitung statt (Lomniczi et al. 1984; Mettenleiter et al. 1985). Abweichend davon führte die Infektion von Neuronen mit PrV-Bartha in der vorliegenden Arbeit zum Nachweis von anterogradem Kapsidtransport. Somit muss die anterograde Ausbreitung zwischen transsynaptisch verbundenen Neuronen im Tier und der anterograde intraaxonale Transport unterschieden werden. Es ist zu vermuten, dass die Proteine gE, gI und pUS9 an der Freisetzung der Viruspartikel im Bereich der Synapse beteiligt sind.

6 Zusammenfassung

1. Durch elektronenmikroskopische Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass PrV in der murinen neuronalen Zellkultur intraaxonal anterograd in Form von vollständig umhüllten Viruspartikeln in Vesikeln transportiert wird.
2. PrV-Bartha ist *in vitro* auch zum anterograden Kapsidtransport fähig.
3. Die Deletion von pUS9 und pUL11 führte erst 48 h p.i. in Neuronen zum Nachweis von anterogradem Kapsidtransport. Dies konnte auch nach Doppeldeletion beider Proteine beobachtet werden.
4. Die Deletion von gE führte *in vitro* nicht zur Beeinträchtigung des anterograden Transportes.
5. Bei Abwesenheit von pUL37 fand 24 h p.i. kein anterograde Kapsidtransport statt.
6. Die Proteine pUL37 und pUL36 sind nicht essentiell für den retrograden Transport zum Zellkern. *In vivo* fehlt bei Abwesenheit beider Proteine jedoch eine Neuroinvasion.
7. In Mäusen erfolgte die In-vivo-Charakterisierung einzelner UL36-Deletionsmutanten. Dabei zeigte sich, dass die Deletion einzelner Aminosäuren am 3'- oder 5'- Ende lediglich eine leicht verzögerte Neuroinvasion zur Folge hatte.
8. Der Austausch des aktiven Zentrums in der Deubiquitinierungsdomäne von pUL36 führte zu einer zweifach verlängerten Überlebenszeit in infizierten Mäusen.
9. In-vivo-Untersuchungen mit PrV- Δ UL35 und PrV-UL35GFP belegten, dass eine Fusion von pUL35 mit GFP zur funktionellen Deletion des Proteins führte.
10. PrV- Δ UL21/US3 zeigte *in vivo* einen stark veränderten Phänotyp im Vergleich zum Wildtyp. Die intranasale Inokulation führte nur bei der Hälfte der Tiere zum Tod. Pathohistologisch fand sich in den Mäusen eine hochgradige Meningoenzephalitis mit zahlreichen infizierten kortikalen Neuronen.
11. In der neuronalen Zellkultur konnte nach Infektion von PrV- Δ UL21/US3mCherry kein anterograde Kapsidtransport nachgewiesen werden.
12. Die intradermale Inokulation von PrV-Kaplan in Mäusen führte zur Neuroinvasion über das Rückenmark und zum Nachweis infizierter Neuronen im somatosensorischen Cortex ab 90 h p.i.

13. Die intranasale Infektion von Haus- und Wildschweinen mit PrV-NIA3 ergab eine mittlere Überlebenszeit von 5-7 d. Die histopathologischen und immunhistologischen Befunde sind in den Haus- und Wildschweinen identisch.
14. Mittels Real-time PCR gelang der Nachweis von PrV-DNA bei allen Tieren aus Tonsille, Trigeminalganglion und Großhirn.

7 Summary

1. Electron microscopic investigations revealed that in murine neuronal cell culture PrV is transported intra-axonally anterogradely in the form of completely enveloped virus particles within vesicles.
2. *In vitro*, PrV-Bartha is also capable of anterograde capsid transport.
3. After deletion of pUS9 and pUL11 anterograde capsid transport was not detectable in neurons until 48 h p.i. This was also observed after simultaneous deletion of both proteins.
4. *In vitro*, anterograde transport was not affected by deletion of gE.
5. In the absence of pUL37 no anterograde capsid transport was observed 24 h p.i.
6. The proteins pUL37 and pUL36 are not essential for retrograde transport to the cell nucleus. *In vivo*, however, neuroinvasion does not occur in the absence of both proteins.
7. *In vivo* characterization of individual UL36 deletion mutants was done in mice. It was shown that deletion of individual amino acids at the 3'- or 5'-terminus only resulted in a slight delay of neuroinvasion.
8. The survival time of infected mice was twice longer after exchange of the active-site cysteine of the deubiquitinating domain of pUL36.
9. *In vivo* investigations with PrV-ΔUL35 and PrV-UL35GFP showed that fusion of pUL35 with GFP leads to functional deletion of the protein.
10. *In vivo* PrV-ΔUL21/US3 showed a strongly modified phenotype compared to the wildtype. After intranasal inoculation only 50 % of the animals died. Pathohistologically, the mice showed severe meningoencephalitis with numerous infected cortical neurons.
11. In neuronal cell culture, no anterograde capsid transport was detected after infection of PrV-ΔUL21/US3mCherry.
12. Intradermal inoculation of PrV-Kaplan in mice resulted in neuroinvasion via the spinal cord and in detection of infected neurons in the somatosensory cortex starting 90 h p.i.
13. The mean survival time of domestic pigs and wild boar after intranasal infection with PrV-NIA3 was 5-7 d. The pathohistological and immunohistological findings in domestic pigs and wild boar are identical.

14. By real-time PCR PrV-DNA was detected in the tonsils, trigeminal ganglion and cerebrum of all animals.

8 Literaturverzeichnis

Abramoff MD, Magelhaes PJ, Ram SJ (2004) Image Processing with ImageJ. *Biophotonics International* 11: 36-42

Antinone SE, Shubeita GT, Coller KE, Lee JI, Haverlock-Moyns S, Gross SP, Smith GA (2006) The Herpesvirus capsid surface protein, VP26, and the majority of the tegument proteins are dispensable for capsid transport toward the nucleus. *J Virol* 80: 5494-5498

Antinone SE, Smith GA (2006) Two modes of herpesvirus trafficking in neurons: membrane acquisition directs motion. *J Virol* 80: 11235-11240

Asano S, Honda T, Goshima F, Nishiyama Y, Sugiura Y (2000) US3 protein kinase of herpes simplex virus protects primary afferent neurons from virus-induced apoptosis in ICR mice. *Neurosci Lett* 294: 105-108

Aujeszký A (1902) Über eine neue Infektionskrankheit bei Haustieren. *Zbl Bakt Abt 1*: 42-45

Babic N, Mettenleiter TC, Flamand A, Ugolini G (1993) Role of essential glycoproteins gII and gp50 in transneuronal transfer of pseudorabies virus from the hypoglossal nerves of mice. *J Virol* 67: 4421-4426

Babic N, Mettenleiter TC, Ugolini G, Flamand A, Coulon P (1994) Propagation of pseudorabies virus in the nervous system of the mouse after intranasal inoculation. *Virology* 204: 616-625

Babic N, Klupp BG, Makoschey B, Karger A, Flamand A, Mettenleiter TC (1996) Glycoprotein gH of pseudorabies virus is essential for penetration and propagation in cell culture and in the nervous system of mice. *J Gen Virol* 77: 2277-2285

Banfield BW, Yap GS, Knapp AC, Enquist LW (1998) A chicken embryo eye model for the analysis of alphaherpesvirus neuronal spread and virulence. *J Virol* 72: 4580-4588

Banker G, Goslin K (1988) Developments in neuronal cell culture. *Nature* 336: 185-186

Bartha A (1961) Experimental reduction of virulence of Aujeszký's disease virus. *Magy. Allatorv. Lapja* 16: 42-45

Baskerville A, McFerran JB, Dow C (1973) Aujeszký's disease in pigs. *Vet. Bull.* 43: 465-480.

Batterson W, Roizman B (1983) Characterization of the herpes simplex virion-associated factor responsible for the induction of alpha genes. *J Virol* 46: 371-377

- Baumeister J, Klupp BG, Mettenleiter TC (1995)** Pseudorabies virus and equine herpesvirus 1 share a nonessential gene which is absent in other herpesviruses and located adjacent to a highly conserved gene cluster. *J Virol* 69: 5560-7
- Bechtel JT, Shenk T (2002)** Human cytomegalovirus UL47 tegument protein functions after entry and before immediate-early gene expression. *J Virol* 76: 1043-1050
- Ben-Porat T, DeMarchi JM, Lomniczi B, Kaplan AS (1986)** Role of glycoproteins of pseudorabies virus in eliciting neutralizing antibodies. *Virology* 154: 325-334
- Berthomme H, Jacquemont B, Epstein A (1993)** The pseudorabies virus host-shutoff homolog gene: nucleotide sequence and comparison with alphaherpesvirus protein counterparts. *Virology* 193: 1028-1032
- Borst EM, Mathys S, Wagner M, Muranyi W, Messerle M (2001)** Genetic evidence of an essential role for cytomegalovirus small capsid protein in viral growth. *J Virol* 75: 1450-1458
- Böttcher S, Granzow H, Maresch C, Möhl B, Klupp BG, Mettenleiter TC (2007)** Identification of functional domains within the essential large tegument protein pUL36 of pseudorabies virus. *J Virol* 81: 13403-13411
- Böttcher S, Klupp BG, Granzow H, Fuchs W, Michael K, Mettenleiter TC (2006)** Identification of a 709-amino-acid internal nonessential region within the essential conserved tegument protein (p)UL36 of pseudorabies virus. *J Virol* 80: 9910-9915
- Böttcher S, Maresch C, Granzow H, Klupp BG, Teifke JP, Mettenleiter TC (2008)** Mutagenesis of the active-site cysteine in the ubiquitin-specific protease contained in large tegument protein pUL36 of pseudorabies virus impairs viral replication in vitro and neuroinvasion in vivo. *J Virol* 82: 6009-6016
- Brideau AD, Banfield BW, Enquist LW (1998)** The Us9 gene product of pseudorabies virus, an alphaherpesvirus, is a phosphorylated, tail-anchored type II membrane protein. *J Virol* 72: 4560-4570
- Brideau AD, Enquist LW, Tirabassi RS (2000)** The role of virion membrane protein endocytosis in the herpesvirus life cycle. *J Clin Virol* 17: 69-82
- Brittle EE, Reynolds AE, Enquist LW (2004)** Two modes of pseudorabies virus neuroinvasion and lethality in mice. *J Virol* 78: 12951-12963
- Butchi NB, Jones C, Perez S, Doster A, Chowdhury SI (2007)** Envelope protein Us9 is required for the anterograde transport of bovine herpesvirus type 1 from trigeminal ganglia to nose and eye upon reactivation. *J Neurovirol* 13: 384-388
- Campbell ME, Palfreyman JW, Preston CM (1984)** Identification of herpes simplex virus DNA sequences which encode a trans-acting polypeptide responsible for stimulation of immediate early transcription. *J Mol Biol* 180: 1-19
- Card JP, Enquist LW (2001)** Transneuronal circuit analysis with pseudorabies viruses. *Curr Protoc Neurosci* Chapter 1: Unit1.5. Review

Card JP, Rinaman L, Schwaber JS, Miselis RR, Whealy ME, Robbins AK, Enquist LW (1990) Neurotropic properties of pseudorabies virus: uptake and transneuronal passage in the rat central nervous system. *J Neurosci* 10: 1974-1994

Card JP, Whealy ME, Robbins AK, Enquist LW (1992) Pseudorabies virus envelope glycoprotein gI influences both neurotropism and virulence during infection of the rat visual system. *J Virol* 66: 3032-3041

Card JP, Whealy ME, Robbins AK, Moore RY, Enquist LW (1991) Two alpha-herpesvirus strains are transported differentially in the rodent visual system. *Neuron* 6: 957-969

Cheung AK (1989) DNA nucleotide sequence analysis of the immediate-early gene of pseudorabies virus. *Nucleic Acids Res* 17: 4637-4646

Cheung AK (1995) Investigation of pseudorabies virus DNA and RNA in trigeminal ganglia and tonsil tissues of latently infected swine. *Am J Vet Res* 56: 45-50

Chi JH, Harley CA, Mukhopadhyay A, Wilson DW (2005) The cytoplasmic tail of herpes simplex virus envelope glycoprotein D binds to the tegument protein VP22 and to capsids. *J Gen Virol* 86: 253-261

Ch'ng TH, Flood EA, Enquist LW (2005) Culturing primary and transformed neuronal cells for studying pseudorabies virus infection. *Methods Mol Biol* 292: 299-316

Ch'ng TH, Enquist LW (2005a) Efficient axonal localization of alphaherpesvirus structural proteins in cultured sympathetic neurons requires viral glycoprotein E. *J Virol* 79: 8835-8846

Ch'ng TH, Enquist LW (2005b) Neuron-to-cell spread of pseudorabies virus in a compartmented neuronal culture system. *J Virol* 79: 10875-10889

Ch'ng TH, Enquist LW (2006) An in vitro system to study trans-neuronal spread of pseudorabies virus infection. *Vet Microbiol* 113: 193-197

Chowdhury SI, Onderci M, Bhattacharjee PS, Al-Mubarak A, Weiss ML, Zhou Y (2002) Bovine herpesvirus 5 (BHV-5) Us9 is essential for BHV-5 neuropathogenesis. *J Virol* 76: 3839-3851

Craig AD, Jr., Burton H (1981) Spinal and medullary lamina I projection to nucleus submedius in medial thalamus: a possible pain center. *J Neurophysiol* 45: 443-466

Dado RJ, Giesler GJ, Jr. (1990) Afferent input to nucleus submedius in rats: retrograde labeling of neurons in the spinal cord and caudal medulla. *J Neurosci* 10: 2672-2686

Darian-Smith I (1973) The trigeminal system: Handbook of sensory physiology, Vol. 2, The Somatosensory System. Springer Verlag, New York: 271-314

- Davison AJ (1992)** Channel catfish virus: a new type of herpesvirus. *Virology* 186: 9-14
- Davison AJ, Trus BL, Cheng N, Steven AC, Watson MS, Cunningham C, Le Deuff RM, Renault T (2005)** A novel class of herpesvirus with bivalve hosts. *J Gen Virol* 86: 41-53
- Davison AJ, Eberle R, Ehlers B, Hayward GS, McGeoch DJ, Minson AC, Pellett PE, Roizman B, Studdert MJ, Thiry E (2009)** The order Herpesvirales. *Arch Virol* 154: 171-177
- de Wind N, Wagenaar F, Pol J, Kimman T, Berns A (1992)** The pseudorabies virus homology of the herpes simplex virus UL21 gene product is a capsid protein which is involved in capsid maturation. *J Virol* 66: 7096-7103
- del Rio T, DeCoste CJ, Enquist LW (2005)** Actin is a component of the compensation mechanism in pseudorabies virus virions lacking the major tegument protein VP22. *J Virol* 79: 8614-8619
- Desai PJ (2000)** A null mutation in the UL36 gene of herpes simplex virus type 1 results in accumulation of unenveloped DNA-filled capsids in the cytoplasm of infected cells. *J Virol* 74: 11608-11618
- Desai P, DeLuca A, Person S (1998)** Herpes simplex virus type 1 VP26 is not essential for replication in cell culture but influences production of infectious virus in the nervous system of infected mice. *Virology* 247: 115-124.
- Desai P, Person S (1998)** Incorporation of the green fluorescent protein into the herpes simplex virus type 1 capsid. *J Virol* 72: 7563-7568
- Desai P, Sexton GL, McCaffery JM, Person S (2001)** A null mutation in the gene encoding the herpes simplex virus type 1 UL37 polypeptide abrogates virus maturation. *J Virol* 75: 10259-71
- Diefenbach RJ, Diefenbach E, Douglas MW, Cunningham AL (2002)** The heavy chain of conventional kinesin interacts with the SNARE proteins SNAP25 and SNAP23. *Biochemistry* 41: 14906-14915
- Diefenbach RJ, Diefenbach E, Douglas MW, Cunningham AL (2004)** The ribosome receptor, p180, interacts with kinesin heavy chain, KIF5B. *Biochem Biophys Res Commun* 319: 987-992
- Diefenbach RJ, Miranda-Saksena M, Douglas MW, Cunningham AL (2008)** Transport and egress of herpes simplex virus in neurons. *Rev Med Virol* 18: 35-51
- Dieuzy I, Vannier P, Jestin A (1987)** Effects of experimental pseudorabies virus infection on vaccinated pregnant sows. *Ann Rech Vet* 18: 233-240
- Dijkstra JM, Gerdt V, Klupp BG, Mettenleiter TC (1997)** Deletion of glycoprotein gM of pseudorabies virus results in attenuation for the natural host.

J Gen Virol 78: 2147-51

Dijkstra JM, Visser N, Mettenleiter TC, Klupp BG (1996) Identification and characterization of pseudorabies virus glycoprotein gM as a nonessential virion component. J Virol 70: 5684-8

Döhner K, Radtke K, Schmidt S, Sodeik B (2006) Eclipse phase of herpes simplex virus type 1 infection: efficient dynein-mediated capsid transport without the small capsid protein VP26. J Virol 80: 8211-8224

Döhner K, Wolfstein A, Prank U, Echeverri C, Dujardin D, Vallee R, Sodeik B (2002) Function of dynein and dynactin in herpes simplex virus capsid transport. Mol Biol Cell 13: 2795-2809

Douglas MW, Diefenbach RJ, Homa FL, Miranda-Saksena M, Rixon FJ, Vittone V, Byth K, Cunningham AL (2004) Herpes simplex virus type 1 capsid protein VP26 interacts with dynein light chains RP3 and Tctex1 and plays a role in retrograde cellular transport. J Biol Chem 279: 28522-32850

Ekstrand MI, Enquist LW, Pomeranz LE (2008) The alpha-herpesviruses: molecular pathfinders in nervous system circuits. Trends Mol Med 14: 134-40

Enquist LW (2002) Exploiting circuit-specific spread of pseudorabies virus in the central nervous system: insights to pathogenesis and circuit tracers. J Infect Dis 186 Suppl 2: S209-214

Enquist LW, Husak PJ, Banfield BW, Smith GA (1998) Infection and spread of alphaherpesviruses in the nervous system. Adv Virus Res 51: 237-347

Ezura K, Usami Y, Tajima K, Komaniwa H, Nagai S, Narita M, Kawashima K (1995) Gastrointestinal and skin lesions in piglets naturally infected with pseudorabies virus. J Vet Diagn Invest 7: 451-5

Favoreel HW, Van Minnebruggen G, Adriaensen D, Nauwynck HJ (2005) Cytoskeletal rearrangements and cell extensions induced by the US3 kinase of an alphaherpesvirus are associated with enhanced spread. Proc Natl Acad Sci U S A 102: 8990-5

Fuchs E, Cleveland DW (1998) A structural scaffolding of intermediate filaments in health and disease. Science 279: 514-519

Fuchs W, Klupp BG, Granzow H, Mettenleiter TC (1997) The UL20 gene product of pseudorabies virus functions in virus egress. J Virol 71: 5639-5646

Fuchs W, Granzow H, Klopffleisch R, Klupp BG, Rosenkranz D, Mettenleiter TC (2005) The UL7 gene of pseudorabies virus encodes a nonessential structural protein which is involved in virion formation and egress. J Virol 79: 11291-9

Fuchs W, Granzow H, Klupp BG, Kopp M, Mettenleiter TC (2002a) The UL48 tegument protein of pseudorabies virus is critical for intracytoplasmic assembly of infectious virions. J Virol 76: 6729-6742

- Fuchs W, Granzow H, Klupp BG, Karger A, Michael K, Maresch C, Klopffleisch R, Mettenleiter TC (2007)** Relevance of the interaction between alphaherpesvirus UL3.5 and UL48 proteins for virion maturation and neuroinvasion. *J Virol* 81: 9307-9318
- Fuchs W, Klupp BG, Granzow H, Mettenleiter TC (1997)** The UL20 gene product of pseudorabies virus functions in virus egress. *J Virol* 71: 5639-5646
- Fuchs W, Klupp BG, Granzow H, Osterrieder N, Mettenleiter TC (2002b)** The interacting UL31 and UL34 gene products of pseudorabies virus are involved in egress from the host-cell nucleus and represent components of primary enveloped but not mature virions. *J Virol* 76: 364-378
- Fuchs W, Klupp BG, Granzow H, Hengartner C, Brack A, Mundt A, Enquist LW, Mettenleiter TC (2002c)** Physical interaction between envelope glycoproteins E and M of pseudorabies virus and the major tegument protein UL49. *J Virol* 76: 8208-8217
- Fuchs W, Klupp BG, Granzow H, Mettenleiter TC (2004)** Essential function of the pseudorabies virus UL36 gene product is independent of its interaction with the UL37 protein. *J Virol* 78: 11879-11889
- Garner MM, Helmick K, Ochsenreiter J, Richman LK, Latimer E, Wise AG, Maes RK, Kiupel M, Nordhausen RW, Zong JC, Hayward GS (2009)** Clinico-pathologic features of fatal disease attributed to new variants of endotheliotropic herpesviruses in two asian elephants (*Elephas maximus*). *Vet Pathol* 46: 97-104
- Geenen K, Favoreel HW, Olsen L, Enquist LW, Nauwynck HJ (2005)** The pseudorabies virus US3 protein kinase possesses anti-apoptotic activity that protects cells from apoptosis during infection and after treatment with sorbitol or staurosporine. *Virology* 331: 144-150
- Gerdts V, Beyer J, Lomniczi B, Mettenleiter TC (2000)** Pseudorabies virus expressing bovine herpesvirus 1 glycoprotein B exhibits altered neurotropism and increased neurovirulence. *J Virol* 74: 817-27
- Gerdts V, Jons A, Makoschey B, Visser N, Mettenleiter TC (1997)** Protection of pigs against Aujeszky's disease by DNA vaccination. *J Gen Virol* 78: 2139-2146
- Ginzburg I (1991)** Neuronal polarity: targeting of microtubule components into axons and dendrites. *Trends Biochem Sci* 16: 257-261
- Goldstein LS, Yang Z (2000)** Microtubule-based transport systems in neurons: the roles of kinesins and dyneins. *Annu Rev Neurosci* 23: 39-71
- Goodpasture EW, Teague O (1923)** Experimental production of herpetic lesions in organs and tissues of the rabbit. *J Med Res* 44: 121-138
- Goslin K, Schreyer DJ, Skene JH, Banker G (1988)** Development of neuronal polarity: GAP-43 distinguishes axonal from dendritic growth cones. *Nature* 336: 672-674

- Graewe S, Retzlaff S, Struck N, Janse CJ, Heussler VT (2009)** Going live: a comparative analysis of the suitability of the RFP derivatives RedStar, mCherry and tdTomato for intravital and in vitro live imaging of Plasmodium parasites. *Biotechnol J* 4: 895-902
- Granstedt AE, Szpara ML, Kuhn B, Wang SS, Enquist LW (2009)** Fluorescence-based monitoring of in vivo neural activity using a circuit-tracing pseudorabies virus. *PLoS One* 9;4: e6923
- Granzow H, Weiland F, Jons A, Klupp BG, Karger A, Mettenleiter TC (1997)** Ultrastructural analysis of the replication cycle of pseudorabies virus in cell culture: a reassessment. *J Virol* 71: 2072-2082
- Granzow H, Klupp BG, Fuchs W, Veits J, Osterrieder N, Mettenleiter TC (2001)** Egress of alphaherpesviruses: comparative ultrastructural study. *J Virol* 75: 3675-3684
- Granzow H, Klupp BG, Mettenleiter TC (2004)** The pseudorabies virus US3 protein is a component of primary and of mature virions. *J Virol* 78: 1314-1323
- Granzow H, Klupp BG, Mettenleiter TC (2005)** Entry of pseudorabies virus: an immunogold-labeling study. *J Virol* 79: 3200-3205
- Gross ST, Harley CA, Wilson DW (2003)** The cytoplasmic tail of Herpes simplex virus glycoprotein H binds to the tegument protein VP16 in vitro and in vivo. *Virology* 317: 1-12
- Harley CA, Dasgupta A, Wilson DW (2001)** Characterization of herpes simplex virus-containing organelles by subcellular fractionation: role for organelle acidification in assembly of infectious particles. *J Virol* 75: 1236-1251
- Harrison RG (1910)** The outgrowth of the nerve fiber as a mode of protoplasmic movement. *J Exp Zool* 9: 787-846
- Herold BC, Visalli RJ, Susmarski N, Brandt CR, Spear PG (1994)** Glycoprotein C-independent binding of herpes simplex virus to cells requires cell surface heparan sulphate and glycoprotein B. *J Gen Virol* 75: 1211-1222
- Hinson VK, Tyor WR (2001)** Update on viral encephalitis. *Curr Opin Neurol* 14: 369-374
- Hirokawa N (1998)** Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport. *Science* 279: 519-526
- Hirokawa N, Takemura R (2004)** Kinesin superfamily proteins and their various functions and dynamics. *Exp Cell Res* 301: 50-59
- Hirokawa N, Takemura R (2005)** Molecular motors and mechanisms of directional transport in neurons. *Nat Rev Neurosci* 6: 201-214

- Holland DJ, Miranda-Saksena M, Boadle RA, Armati P, Cunningham AL (1999)** Anterograde transport of herpes simplex virus proteins in axons of peripheral human fetal neurons: an immunoelectron microscopy study. *J Virol* 73: 8503-8511
- Homa FL, Brown JC (1997)** Capsid assembly and DNA packaging in herpes simplex virus. *Rev Med Virol* 7: 107-122
- Honess RW, Watson DH (1977)** Unity and diversity in the herpesviruses. *J Gen Virol* 37: 15-37
- Horváth S, Kis Z, Boldogkői Z, Nógrádi A, Toldi J (2002)** Oestrogen-dependent tracing in the rat CNS after pseudorabies virus infection. *Eur J Neurosci* 15: 937-43
- Hsu SM, Raine L, Fanger H (1981)** Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 29: 577-580
- Huemer HP, Larcher C, Coe NE (1992)** Pseudorabies virus glycoprotein III derived from virions and infected cells binds to the third component of complement. *Virus Res* 23: 271-280
- Ilouze M, Dishon A, Kahan T, Kotler M (2006)** Cyprinid herpes virus-3 (CyHV-3) bears genes of genetically distant large DNA viruses. *FEBS Lett* 580: 4473-4478
- Jacobs L, Mulder WA, Priem J, Pol JM, Kimman TG (1994)** Glycoprotein I of pseudorabies virus (Aujeszky's disease virus) determines virulence and facilitates penetration of the virus into the central nervous system of pigs. *Acta Vet Hung* 42: 289-300
- Johannsen E, Luftig M, Chase MR, Weicksel S, Cahir-McFarland E, Illanes D, Sarracino D, Kieff E (2004)** Proteins of purified Epstein-Barr virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 16286-16291
- Jöns A, Dijkstra JM, Mettenleiter TC (1998)** Glycoproteins M and N of pseudorabies virus form a disulfide-linked complex. *J Virol* 72: 550-7
- Jovasevic V, Liang L, Roizman B (2008)** Proteolytic cleavage of VP1-2 is required for release of herpes simplex virus 1 DNA into the nucleus. *J Virol* 82: 3311-3319
- Kaplan AS, Vatter AE (1959)** A comparison of herpes simplex and pseudorabies viruses. *Virology* 7: 394-407
- Karger A, Mettenleiter TC (1993)** Glycoproteins gIII and gp50 play dominant roles in the biphasic attachment of pseudorabies virus. *Virology* 194: 654-664
- Karger A, Saalmuller A, Tufaro F, Banfield BW, Mettenleiter TC (1995)** Cell surface proteoglycans are not essential for infection by pseudorabies virus. *J Virol* 69: 3482-3489

Kattenhorn LM, Korbel GA, Kessler BM, Spooner E, Ploegh HL (2005) A deubiquitinating enzyme encoded by HSV-1 belongs to a family of cysteine proteases that is conserved across the family Herpesviridae. *Mol Cell* 19: 547-557

Kattenhorn LM, Mills R, Wagner M, Lomsadze A, Makeev V, Borodovsky M, Ploegh HL, Kessler BM (2004) Identification of proteins associated with murine cytomegalovirus virions. *J Virol* 78: 11187-11197

Klopfleisch R, Teifke JP, Fuchs W, Kopp M, Klupp BG, Mettenleiter TC (2004) Influence of tegument proteins of pseudorabies virus on neuroinvasion and transneuronal spread in the nervous system of adult mice after intranasal inoculation. *J Virol* 78: 2956-2966

Klopfleisch R, Klupp BG, Fuchs W, Kopp M, Teifke JP, Mettenleiter TC (2006) Influence of pseudorabies virus proteins on neuroinvasion and neurovirulence in mice. *J Virol* 80: 5571-5576

Klupp B, Altenschmidt J, Granzow H, Fuchs W, Mettenleiter TC (2008) Glycoproteins required for entry are not necessary for egress of pseudorabies virus. *J Virol* 82: 6299-6309

Klupp BG, Baumeister J, Dietz P, Granzow H, Mettenleiter TC (1998) Pseudorabies virus glycoprotein gK is a virion structural component involved in virus release but is not required for entry. *J Virol* 72: 1949-1958.

Klupp BG, Altenschmidt J, Granzow H, Fuchs W, Mettenleiter TC (2005a) Identification and characterization of the pseudorabies virus UL43 protein. *Virology* 334: 224-233.

Klupp BG, Granzow H, Keil GM, Mettenleiter TC (2006) The capsid-associated UL25 protein of the alphaherpesvirus pseudorabies virus is nonessential for cleavage and encapsidation of genomic DNA but is required for nuclear egress of capsids. *J Virol* 80: 6235-6246

Klupp BG, Granzow H, Mettenleiter TC (2000) Primary envelopment of pseudorabies virus at the nuclear membrane requires the UL34 gene product. *J Virol* 74: 10063-10073

Klupp BG, Granzow H, Mundt E, Mettenleiter TC (2001) Pseudorabies virus UL37 gene product is involved in secondary envelopment. *J Virol* 75: 8927-8936

Klupp BG, Fuchs W, Granzow H, Nixdorf R, Mettenleiter TC (2002) Pseudorabies virus UL36 tegument protein physically interacts with the UL37 protein. *J Virol* 76: 3065-3071

Klupp BG, Hengartner CJ, Mettenleiter TC, Enquist LW (2004) Complete, annotated sequence of the pseudorabies virus genome. *J Virol* 78: 424-440

Klupp BG, Granzow H, Karger A, Mettenleiter TC (2005b) Identification, subviral localization, and functional characterization of the pseudorabies virus UL17 protein. *J Virol* 79: 13442-13453

Klupp BG, Granzow H, Keil GM, Mettenleiter TC (2006) The capsid-associated UL25 protein of the alphaherpesvirus pseudorabies virus is nonessential for cleavage and encapsidation of genomic DNA but is required for nuclear egress of capsids. *J Virol* 80: 6235-6246

Klupp BG, Lomniczi B, Visser N, Fuchs W, Mettenleiter TC (1995) Mutations affecting the UL21 gene contribute to avirulence of pseudorabies virus vaccine strain Bartha. *Virology* 212: 466-473

Kopp M, Granzow H, Fuchs W, Klupp B, Mettenleiter TC (2004) Simultaneous deletion of pseudorabies virus tegument protein UL11 and glycoprotein M severely impairs secondary envelopment. *J Virol* 78: 3024-3034

Kopp M, Granzow H, Fuchs W, Klupp BG, Mundt E, Karger A, Mettenleiter TC (2003) The pseudorabies virus UL11 protein is a virion component involved in secondary envelopment in the cytoplasm. *J Virol* 77: 5339-5351

Krautwald M, Fuchs W, Klupp BG, Mettenleiter TC (2009) Translocation of incoming pseudorabies virus capsids to the cell nucleus is delayed in the absence of tegument protein pUL37. *J Virol* 83: 3389-96

Krautwald M, Maresch C, Klupp BG, Fuchs W, Mettenleiter TC (2008) Deletion or green fluorescent protein tagging of the pUL35 capsid component of pseudorabies virus impairs virus replication in cell culture and neuroinvasion in mice. *J Gen Virol* 89: 1346-1351

Kristensson K, Nennesmo L, Persson L, Lycke E (1982) Neuron to neuron transmission of herpes simplex virus. Transport of virus from skin to brainstem nuclei. *J Neurol Sci* 54: 149-156

Kristensson K, Lycke E, Roytta M, Svennerholm B, Vahlne A (1986) Neuritic transport of herpes simplex virus in rat sensory neurons in vitro. Effects of substances interacting with microtubular function and axonal flow [nocodazole, taxol and erythro-9-3-(2-hydroxynonyl)adenine]. *J Gen Virol* 67: 2023-2028

Kurachi R, Daikoku T, Tsurumi T, Maeno K, Nishiyama Y, Kurata T (1993) The pathogenicity of a US3 protein kinase-deficient mutant of herpes simplex virus type 2 in mice. *Arch Virol* 133: 259-723

Kwong AD, Frenkel N (1989) The herpes simplex virus virion host shutoff function. *J Virol* 63: 4834-4839

LaVail JH, Tauscher AN, Aghaian E, Harrabi O, Sidhu SS (2003) Axonal transport and sorting of herpes simplex virus components in a mature mouse visual system. *J Virol* 77: 6117-6126

- LaVail JH, Tauscher AN, Hicks JW, Harrabi O, Melroe GT, Knipe DM (2005)** Genetic and molecular in vivo analysis of herpes simplex virus assembly in murine visual system neurons. *J Virol* 79: 11142-11150
- LaVail JH, Tauscher AN, Sucher A, Harrabi O, Brandimarti R (2007)** Viral regulation of the long distance axonal transport of herpes simplex virus nucleocapsid. *Neuroscience* 146: 974-985
- Lee JW, Erskine MS (2000)** Pseudorabies virus tracing of neural pathways between the uterine cervix and CNS: effects of survival time, estrogen treatment, rhizotomy, and pelvic nerve transection. *J Comp Neurol* 20;418: 484-503
- Lee JI, Luxton GW, Smith GA (2006)** Identification of an essential domain in the herpesvirus VP1/2 tegument protein: the carboxy terminus directs incorporation into capsid assemblons. *J Virol* 80: 12086-12094
- Lomniczi B, Blankenship ML, Ben-Porat T (1984)** Deletions in the genomes of pseudorabies virus vaccine strains and existence of four isomers of the genomes. *J Virol* 49: 970-979
- Lutz W (2009)** Die vergessene Gefahr. *Rheinisch-Westfälischer Jäger* 6: 10-11
- Luxton GW, Haverlock S, Coller KE, Antinone SE, Pincetic A, Smith GA (2005)** Targeting of herpesvirus capsid transport in axons is coupled to association with specific sets of tegument proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 5832-5837
- Luxton GW, Lee JI, Haverlock-Moyns S, Schober JM, Smith GA (2006)** The pseudorabies virus VP1/2 tegument protein is required for intracellular capsid transport. *J Virol* 80: 201-209
- Lycke E, Kristensson K, Svennerholm B, Vahlne A, Ziegler R (1984)** Uptake and transport of herpes simplex virus in neurites of rat dorsal root ganglia cells in culture. *J Gen Virol* 65: 55-64
- Lyman MG, Curanovic D, Brideau AD, Enquist LW (2008)** Fusion of enhanced green fluorescent protein to the pseudorabies virus axonal sorting protein Us9 blocks anterograde spread of infection in mammalian neurons. *J Virol* 82: 10308-10311
- Lyman MG, Feierbach B, Curanovic D, Bisher M, Enquist LW (2007)** Pseudorabies virus Us9 directs axonal sorting of viral capsids. *J Virol* 81: 11363-11371
- Martin X, Dolivo M (1983)** Neuronal and transneuronal tracing in the trigeminal system of the rat using the herpes virus suis. *Brain Res* 273: 253-276
- McFerran JB, Dow C (1965)** The distribution of the virus of aujeszky's disease (Pseudorabies virus) in experimentally infected swine. *Am J Vet Res* 26: 631-635
- McGeoch DJ, Gatherer D (2005)** Integrating reptilian herpesviruses into the family herpesviridae. *J Virol* 79: 725-731

McGeoch DJ, Rixon FJ, Davison AJ (2006) Topics in herpesvirus genomics and evolution. *Virus Res* 117: 90-104

McGraw HM, Awasthi S, Wojcechowskyj JA, Friedman HM (2009) Anterograde spread of herpes simplex virus type 1 requires glycoprotein E and glycoprotein I but not Us9. *J Virol* 83: 8315-26

McNabb DS, Courtney RJ (1992) Analysis of the UL36 open reading frame encoding the large tegument protein (ICP1/2) of herpes simplex virus type 1. *J Virol* 66: 7581-7584

Meignier B, Longnecker R, Mavromara-Nazos P, Sears AE, Roizman B (1988) Virulence of and establishment of latency by genetically engineered deletion mutants of herpes simplex virus 1. *Virology* 162: 251-254

Mettenleiter TC, Lukàcs N, Rziha HJ (1985) Pseudorabies virus avirulent strains fail to express a major glycoprotein. *J Virol* 56: 307-311

Mettenleiter TC, Schreurs C, Zuckermann F, Ben-Porat T, Kaplan AS (1988) Role of glycoprotein gIII of pseudorabies virus in virulence. *J Virol* 62: 2712-2717

Mettenleiter TC, Zsak L, Zuckermann F, Sugg N, Kern H, Ben-Porat T (1990) Interaction of glycoprotein gIII with a cellular heparinlike substance mediates adsorption of pseudorabies virus. *J Virol* 64: 278-286

Mettenleiter TC (1994) Pseudorabies (Aujeszky's disease) virus: state of the art. August 1993. *Acta Vet Hung* 42: 153-77

Mettenleiter TC (1996) Immunobiology of pseudorabies (Aujeszky's disease). *Vet Immunol Immunopathol* 54: 221-229

Mettenleiter TC (2000) Aujeszky's disease (pseudorabies) virus: the virus and molecular pathogenesis--state of the art, June 1999. *Vet Res* 31: 99-115

Mettenleiter TC (2002) Herpesvirus assembly and egress. *J Virol* 76: 1537-1547

Mettenleiter TC (2003) Pathogenesis of neurotropic herpesviruses: role of viral glycoproteins in neuroinvasion and transneuronal spread. *Virus Res* 92: 197-206

Mettenleiter TC (2004) Budding events in herpesvirus morphogenesis. *Virus Res* 106: 167-180

Mettenleiter TC (2006) Intriguing interplay between viral proteins during herpesvirus assembly or: the herpesvirus assembly puzzle. *Vet Microbiol* 113: 163-169

Mettenleiter TC (2008) Pseudorabies Virus. In: *Encyclopedia of Virology* 5. Auflage, Mahy und Van Regenmortel (Hrsg), Elsevier, Oxford: 341-351

Mettenleiter TC, Minson T (2006) Egress of alphaherpesviruses. *J Virol* 80: 1610-1611

Michael K, Klupp BG, Mettenleiter TC, Karger A (2006) Composition of pseudorabies virus particles lacking tegument protein US3, UL47, or UL49 or envelope glycoprotein E. *J Virol* 80: 1332-1339

Mijatov B, Cunningham AL, Diefenbach RJ (2007) Residues F593 and E596 of HSV-1 tegument protein pUL36 (VP1/2) mediate binding of tegument protein pUL37. *Virology* 368: 26-31

Minson AC, Davison A, Eberle R, Desrosiers RC, Fleckenstein B, McGeoch DJ, Pellet PE, Roizman B, Studdert DMJ (2000) Herpesviridae. International Committee on Taxonomy of Viruses. In: *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: 7th Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Fauquet, Bishop, Carstens, Estes, Lemon, Maniloff, Mayo, McGeoch, Pringle, (eds.) Academic Press, New York: 203–255

Miranda-Saksena M, Armati P, Boadle RA, Holland DJ, Cunningham AL (2000) Anterograde transport of herpes simplex virus type 1 in cultured, dissociated human and rat dorsal root ganglion neurons. *J Virol* 74: 1827-1839

Mueller SN, Jones CM, Smith CM, Heath WR, Carbone FR (2002) Rapid cytotoxic T lymphocyte activation occurs in the draining lymph nodes after cutaneous herpes simplex virus infection as a result of early antigen presentation and not the presence of virus. *J Exp Med* 195: 651-656

Ng TI, Ogle WO, Roizman B (1998) UL13 protein kinase of herpes simplex virus 1 complexes with glycoprotein E and mediates the phosphorylation of the viral Fc receptor: glycoproteins E and I. *Virology* 241: 37-48

Nishiyama Y, Yamada Y, Kurachi R, Daikoku T (1992) Construction of a US3 lacZ insertion mutant of herpes simplex virus type 2 and characterization of its phenotype in vitro and in vivo. *Virology* 190: 256-268

Nixdorf R, Klupp BG, Karger A, Mettenleiter TC (2000) Effects of truncation of the carboxy terminus of pseudorabies virus glycoprotein B on infectivity. *J Virol* 74: 7137-45

Ohara PT, Chin MS, LaVail JH (2000) The spread of herpes simplex virus type 1 from trigeminal neurons to the murine cornea: an immunoelectron microscopy study. *J Virol* 74: 4776-4786

Ohara PT, Tauscher AN, LaVail JH (2001) Two paths for dissemination of Herpes simplex virus from infected trigeminal ganglion to the murine cornea. *Brain Res* 899: 260-263

Ogawa-Goto K, Irie S, Omori A, Miura Y, Katano H, Hasegawa H, Kurata T, Sata T, Arao Y (2002) An endoplasmic reticulum protein, p180, is highly expressed in human cytomegalovirus-permissive cells and interacts with the tegument protein encoded by UL48. *J Virol* 76: 2350-2362

Olander HJ, Saunders JR, Gustafson DP, Jones RK (1966) Pathologic findings in swine affected with a virulent strain of Aujeszky's virus. *Pathol Vet.* 3: 64-82

Olsen LM, Ch'ng TH, Card JP, Enquist LW (2006) Role of pseudorabies virus Us3 protein kinase during neuronal infection. *J Virol* 80: 6387-6398

Peeters B, de WN, Hooisma M, Wagenaar F, Gielkens A, Moormann R (1992) Pseudorabies virus envelope glycoproteins gp50 and gII are essential for virus penetration, but only gII is involved in membrane fusion. *J Virol* 66: 894-905

Pellett PE, Roizman B (2007) The family herpesviridae: a brief introduction. In: Fields, Virology. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia. Fünfte Auflage. Kapitel 66: 2479-2499

Penfold ME, Armati P, Cunningham AL (1994) Axonal transport of herpes simplex virions to epidermal cells: evidence for a specialized mode of virus transport and assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 6529-6533

Pol JM, Gielkens AL, van Oirschot JT (1989) Comparative pathogenesis of three strains of pseudorabies virus in pigs. *Microb Pathog.* 7: 361-71

Polcicova K, Goldsmith K, Rainish BL, Wisner TW, Johnson DC (2005) The extracellular domain of herpes simplex virus gE is indispensable for efficient cell-to-cell spread: evidence for gE/gI receptors. *J Virol* 79: 11990-12001

Pomeranz LE, Reynolds AE, Hengartner CJ (2005) Molecular biology of pseudorabies virus: impact on neurovirology and veterinary medicine. *Microbiol Mol Biol Rev* 69: 462-500

Preston VG, Murray J, Preston CM, McDougall IM, Stow ND (2008) The UL25 gene product of herpes simplex virus type 1 is involved in uncoating of the viral genome. *J Virol* 82: 6654-6666

Radtko K, Döhner K, Sodeik B (2006) Viral interactions with the cytoskeleton: a hitchhiker's guide to the cell. *Cell Microbiol* 8: 387-400

Rauh I, Mettenleiter TC (1991) Pseudorabies virus glycoproteins gII and gp50 are essential for virus penetration. *J Virol* 65: 5348-5356

Rea TJ, Timmins JG, Long GW, Post LE (1985) Mapping and sequence of the gene for the pseudorabies virus glycoprotein which accumulates in the medium of infected cells. *J Virol* 54: 21-29

Rixon FJ, Addison C, McGregor A, Macnab SJ, Nicholson P, Preston VG, Tatman JD (1996) Multiple interactions control the intracellular localization of the herpes simplex virus type 1 capsid proteins. *J Gen Virol* 77: 2251-2260

Roizman B (1996) Herpesviridae. In: Fields, BN (ed): Virology 3rd ed Lippincott, Raven Publ, Philadelphia: 2231-2295

Roizman B, Knipe DM (2001) Herpes simplex viruses and their replication. In: Fields virology: 4th ed Lippincott Williams und Wilkins, Philadelphia: 2399-2460

- Roller RJ, Zhou Y, Schnetzer R, Ferguson J, DeSalvo D (2000)** Herpes simplex virus type 1 U(L)34 gene product is required for viral envelopment. *J Virol* 74: 117-129
- Romero CH, Meade PN, Homer BL, Shultz JE, Lollis G (2003)** Potential sites of virus latency associated with indigenous pseudorabies viruses in feral swine. *J Wildl Dis* 39: 567-75
- Rothermel M, Schobel N, Damann N, Klupp BG, Mettenleiter TC, Hatt H, Wetzel CH (2007)** Anterograde transsynaptic tracing in the murine somatosensory system using Pseudorabies virus (PrV): a "live-cell"-tracing tool for analysis of identified neurons in vitro. *J Neurovirol* 13: 579-585
- Rouiller EM, Capt M, Dolivo M, De RF (1989)** Neuronal organization of the stapedius reflex pathways in the rat: a retrograde HRP and viral transneuronal tracing study. *Brain Res* 476: 21-28
- Saksena MM, Wakisaka H, Tijono B, Boadle RA, Rixon F, Takahashi H, Cunningham AL (2006)** Herpes simplex virus type 1 accumulation, envelopment, and exit in growth cones and varicosities in mid-distal regions of axons. *J Virol* 80: 3592-3606
- Schlieker C, Weihofen WA, Frijns E, Kattenhorn LM, Gaudet R, Ploegh HL (2007)** Structure of a herpesvirus-encoded cysteine protease reveals a unique class of deubiquitinating enzymes. *Mol Cell* 25: 677-687
- Seefeldt B, Kasper R, Seidel T, Tinnefeld P, Dietz KJ, Heilemann M, Sauer M (2008)** Fluorescent proteins for single-molecule fluorescence applications. *J Biophotonics* 1: 74-82
- Shaner NC, Steinbach PA, Tsien RY (2005)** A guide to choosing fluorescent proteins. *Nat Methods* 2: 905-909
- Simmons A, Nash AA (1984)** Zosteriform spread of herpes simplex virus as a model of recrudescence and its use to investigate the role of immune cells in prevention of recurrent disease. *J Virol* 52: 816-821
- Smith GA, Gross SP, Enquist LW (2001)** Herpesviruses use bidirectional fast-axonal transport to spread in sensory neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 3466-3470
- Smith GA, Pomeranz L, Gross SP, Enquist LW (2004)** Local modulation of plus-end transport targets herpesvirus entry and egress in sensory axons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 16034-16039
- Snyder A, Bruun B, Browne HM, Johnson DC (2007)** A herpes simplex virus gD-YFP fusion glycoprotein is transported separately from viral capsids in neuronal axons. *J Virol* 81: 8337-8340
- Snyder A, Wisner TW, Johnson DC (2006)** Herpes simplex virus capsids are transported in neuronal axons without an envelope containing the viral glycoproteins. *J Virol* 80: 11165-11177

Sodeik B (2000) Mechanisms of viral transport in the cytoplasm. *Trends Microbiol* 8: 465-472

Sodeik B, Ebersold MW, Helenius A (1997) Microtubule-mediated transport of incoming herpes simplex virus 1 capsids to the nucleus. *J Cell Biol* 136: 1007-1021

Song CK, Enquist LW, Bartness TJ (2005) New developments in tracing neural circuits with herpesviruses. *Virus Res* 111: 235-249

Spear PG (2004) Herpes simplex virus: receptors and ligands for cell entry. *Cell Microbiol* 6: 401-410

Strack AM, Sawyer WB, Platt KB, Loewy AD (1989) CNS cell groups regulating the sympathetic outflow to adrenal gland as revealed by transneuronal cell body labeling with pseudorabies virus. *Brain Res* 491: 274-296

Strack AM, Loewy AD (1990) Pseudorabies virus: a highly specific transneuronal cell body marker in the sympathetic nervous system. *J Neurosci* 10: 2139-2147

Tatman JD, Preston VG, Nicholson P, Elliott RM, Rixon FJ (1994) Assembly of herpes simplex virus type 1 capsids using a panel of recombinant baculoviruses. *J Gen Virol* 75: 1101-1113

Tomishima MJ, Enquist LW (2001) A conserved alpha-herpesvirus protein necessary for axonal localization of viral membrane proteins. *J Cell Biol* 154: 741-752

Tomishima MJ, Enquist LW (2002) In vivo egress of an alphaherpesvirus from axons. *J Virol* 76: 8310-8317

Tomishima MJ, Smith GA, Enquist LW (2001) Sorting and transport of alpha herpesviruses in axons. *Traffic* 2:429-436

Topp KS, Meade LB, LaVail JH (1994) Microtubule polarity in the peripheral processes of trigeminal ganglion cells: relevance for the retrograde transport of herpes simplex virus. *J Neurosci* 14: 318-325

Trus BL, Homa FL, Booy FP, Newcomb WW, Thomsen DR, Cheng N, Brown JC, Steven AC (1995) Herpes simplex virus capsids assembled in insect cells infected with recombinant baculoviruses: structural authenticity and localization of VP26. *J Virol* 69: 7362-7366

Van den Broeke C, Deruelle M, Nauwynck HJ, Coller KE, Smith GA, Van Doorselaere J, Favoreel HW (2009) The kinase activity of pseudorabies virus US3 is required for modulation of the actin cytoskeleton. *Virology* 385: 155-60

Varnum SM, Streblow DN, Monroe ME, Smith P, Auberry KJ, Pasa-Tolic L, Wang D, Camp DG, Rodland K, Wiley S, Britt W, Shenk T, Smith RD, Nelson JA (2004) Identification of proteins in human cytomegalovirus (HCMV) particles: the HCMV proteome. *J Virol* 78: 10960-10966

Vittone V, Diefenbach E, Triffett D, Douglas MW, Cunningham AL, Diefenbach RJ (2005) Determination of interactions between tegument proteins of herpes simplex virus type 1. *J Virol* 79: 9566-9571

Wagenaar F, Pol JM, de Wind N, Kimman TG (2001) Deletion of the UL21 gene in Pseudorabies virus results in the formation of DNA-deprived capsids: an electron microscopy study. *Vet Res* 32: 47-54

Wang J, Loveland AN, Kattenhorn LM, Ploegh HL, Gibson W (2006) High-molecular-weight protein (pUL48) of human cytomegalovirus is a competent deubiquitinating protease: mutant viruses altered in its active-site cysteine or histidine are viable. *J Virol* 80: 6003-6012

Wang F, Tang W, McGraw HM, Bennett J, Enquist LW, Friedman HM (2005) Herpes simplex virus type 1 glycoprotein e is required for axonal localization of capsid, tegument, and membrane glycoproteins. *J Virol* 79: 13362-13372

Ward PL, Barker DE, Roizman B (1996) A novel herpes simplex virus 1 gene, UL43.5, maps antisense to the UL43 gene and encodes a protein which colocalizes in nuclear structures with capsid proteins. *J Virol* 70: 2684-2690

Weeks BS, Ramchandran RS, Hopkins JJ, Friedman HM (2000) Herpes simplex virus type-1 and -2 pathogenesis is restricted by the epidermal basement membrane. *Arch Virol* 145: 385-396

Weiss ML, Dobbs ME, MohanKumar PS, Chowdhury SI, Sawrey K, Guevara-Guzman R, Huang J (2001) The estrous cycle affects pseudorabies virus (PRV) infection of the CNS. *Brain Res* 893: 215-26

Whealy ME, Card JP, Robbins AK, Dubin JR, Rziha HJ, Enquist LW (1993) Specific pseudorabies virus infection of the rat visual system requires both gI and gp63 glycoproteins. *J Virol* 67: 3786-3797

Whitley RJ, Gnann JW (2002) Viral encephalitis: familiar infections and emerging pathogens. *Lancet* 359: 507-513

Wibbelt G, Kurth A, Yasmum N, Bannert M, Nagel S, Nitsche A, Ehlers B (2007) Discovery of herpesviruses in bats. *J Gen Virol* 88: 2651-2655

Wolfstein A, Nagel CH, Radtke K, Döhner K, Allan VJ, Sodeik B (2006) The inner tegument promotes herpes simplex virus capsid motility along microtubules in vitro. *Traffic* 7: 227-237

Wu B, Chen Y, Müller JD (2009) Fluorescence fluctuation spectroscopy of mCherry in living cells. *Biophys J* 96: 2391-2404

WuDunn D, Spear PG (1989) Initial interaction of herpes simplex virus with cells is binding to heparan sulfate. *J Virol* 63: 52-58

Yamada KM, Spooner BS, Wessells NK (1971) Ultrastructure and function of growth cones and axons of cultured nerve cells. *J Cell Biol.* 49: 595-613

Ye GJ, Vaughan KT, Vallee RB, Roizman B (2000) The herpes simplex virus 1 U(L)34 protein interacts with a cytoplasmic dynein intermediate chain and targets nuclear membrane. *J Virol* 74: 1355-1363

Yoshida A, Dostrovsky JO, Sessle BJ, Chiang CY (1991) Trigeminal projections to the nucleus submedialis of the thalamus in the rat. *J Comp Neurol* 307: 609-625

Zhu Q, Courtney RJ (1994) Chemical cross-linking of virion envelope and tegument proteins of herpes simplex virus type 1. *Virology* 204: 590-599

Zuckermann FA, Mettenleiter TC, Schreurs C, Sugg N, Ben-Porat T (1988) Complex between glycoproteins gI and gp63 of pseudorabies virus: its effect on virus replication. *J Virol* 62: 4622-4626

Zuckermann FA, Zsak L, Mettenleiter TC, Ben-Porat T (1990) Pseudorabies virus glycoprotein gIII is a major target antigen for murine and swine virus-specific cytotoxic T lymphocytes. *J Virol* 64: 802-812

9 Anhang

9.1 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ABC	Avidin-Biotin-Complex
AEC	3-Amino-9-Ethyl-Carbazol-staining reagent
AK	Aujeszkysche Krankheit
AlHV-1	alcelaphines Herpesvirus 1
AlHV-2	alcelaphines Herpesvirus 2
AngHV-1	Aal-Herpesvirus
Aqua dest.	Aqua destillata
AS	Aminosäure
ATV	Alsevers Trypsin Versen
BHV-1	Bovines Herpesvirus 1
BSA	Bovines Serumalbumin
°C	Grad Celsius
ca.	Circa
CyHV-3	Koi-Herpesvirus
d	Tag
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan
DMEM	Dulbecco's modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
d p.i.	d post infectionem
dR	Baseline-korrigierte Rohfluoreszenz
ds	Doppelsträngig
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	Enhanced green fluorescent protein
EiHV-1	Endotheliotrope Elefantenherpesvirus 1
EHV-1	Equines Herpesvirus 1

EHV-2	Equines Herpesvirus 2
EHV-4	Equines Herpesvirus 4
EHV-5	Equines Herpesvirus 5
FKS	Fetales Kälberserum
FLI	Friedrich-Loeffler-Institut
g	Gramm
GFAP	Gliales fibrilläres saures Protein
GFP	Green fluorescent protein
GP	Ganglion pterygopalatinum
h	Stunde
HCMV	Humanes Cytomegalievirus
HE	Hämatoxylin/Eosin-Färbung
H ₂ O	Wasser
HBS	Hepes Buffered Saline
HBSS	Hank's balanced salt solution
HHV-6	Humanes Herpesvirus 6
HHV-7	Humanes Herpesvirus 7
h p.i.	h post infectionem
HSV-1	Herpes simplex Virus Typ 1
HSV-2	Herpes simplex Virus Typ 2
IcHV-1	Channel Catfish Virus
ILTV	Virus der infektiösen Laryngotracheitis
ISH	In-situ-Hybridisierung
IR	Internal repeat
Ka	Kaplan
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
KSHV	Kaposi's sarcoma-associated Herpesvirus
M	Molar
M.	Musculus
MCMV	Murines Cytomegalievirus
MDV	Marek's disease virus
Me5	Nucleus mesencephali n. trigemini
MEM	Minimal essential medium

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
mg	Milligramm
ml	Milliliter
min	Minuten
N. (n.)	Nervus (nervi)
n.b.	nicht beobachtet
n.d.	nicht durchgeführt
nm	Nanometer
OsHV-1	Austern-Herpesvirus
OvHV-2	Ovines Herpesvirus 2
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PFU	Plaque forming units
pH	Potentia hydrogenim
PNS	Peripheres Nervensystem
Pr5	Nucleus sensibilis pontinus n. trigemini
PrV	Pseudorabiesvirus
PVP	Polyvinylpyrrolidon
RaHV-1	Ranid Herpesvirus 1
RaHV-2	Ranid Herpesvirus 2
RFP	Red fluorescent protein
RK13	Rabbit kidney cells
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription-PCR
s	Sekunden
SCG	Ganglion cervicale craniale, oberes Zervikalganglion
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sp5	Nucleus tractus spinalis n. trigemini
SSC	Standard Saline Citrate
SSPE	Standard Saline Phosphate EDTA
SuHV-3	Suides Herpesvirus 3
SuHV-4	Suides Herpesvirus 4

SuHV-5	Suides Herpesvirus 5
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Azetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	Tris Buffered Saline
TEMED	Tetramethyldiamin
TEN	Tris-EDTA-Natriumchlorid
TG	Trigeminusganglion, Ganglion trigeminale
TR	Terminal repeat
U	Units
UL	Unique long Region
UpM	Umdrehungen pro Minute
US	Unique short Region
UV	Ultraviolett
VP	Virusprotein
VPM	Nucleus ventroposteriomedialis thalami
VZV	Varicella-Zoster-Virus
YFP	Yellow fluorescent protein
ZNS	Zentrales Nervensystem

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. T. C. Mettenleiter für die Überlassung des Themas und der Möglichkeit der Anfertigung dieser Arbeit am Friedrich-Loeffler-Institut, Insel Riems. Seine wertvollen Anregungen und Hinweise sowie die Unterstützung bei den Publikationen haben sehr zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Herrn Prof. Dr. J. P. Teifke danke ich für die Betreuung der Dissertation sowie der freundlichen Aufnahme in sein Labor. Die konstruktiven Diskussionen und seine große Fachkenntnis sind für mich ein wertvoller bleibender Erfahrungsschatz.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für die finanzielle Unterstützung der Arbeit.

Allen Mitarbeitern des Friedrich-Loeffler-Instituts danke ich für die herzliche Aufnahme sowie für die vielfältige Unterstützung. Ihnen ist es zu verdanken, dass die Zeit auf dem Riems unvergesslich bleibt.

Frau Dr. B. Klupp und Herr Dr. W. Fuchs haben mich mit ihrem beachtlichem Wissen, ihrer Geduld und ihren Anregungen immer unterstützt. Ihnen verdanke ich auch die Bereitstellung der zahlreichen PrV-Deletionsmutanten.

Herr Dr. S. Finke hat mich durch seine wertvollen Erfahrungen auf dem Gebiet der Laser-Scan-Mikroskopie hilfreich unterstützt.

Herrn Dr. habil. H. Granzow und Frau P. Meier danke ich für die Anfertigung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen und die konstruktive Zusammenarbeit.

Herr Prof. L. Enquist und Frau D. Curanovic von der Princeton University haben mit ihrem Wissen zur Neuronenkultivierung sehr zum Gelingen beigetragen

Ein besonderer Dank gilt Frau G. Czerwinski für die Einführung in das wissenschaftliche Arbeiten, für die anregenden Diskussionen sowie für die angenehme Laboratmosphäre.

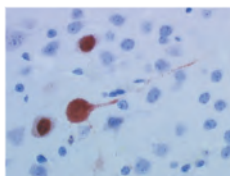
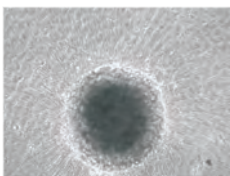
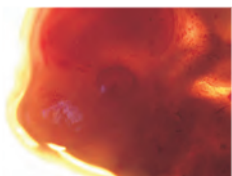
Frau S. Schuparis danke ich für ihre freundliche hilfreiche Unterstützung.

Allen Mitarbeitern der Pathologie und insbesondere Frau A. Breithaupt möchte ich für die schöne Zeit danken.

Meinen Freunden Inga und Björn verdanke ich wunderschöne erlebnisreiche Jahre in Vorpommern. Ohne sie wäre manche Hürde schwer zu meistern und so manches zum Scheitern verurteilt gewesen.

Katrin und Wilfried gilt mein Dank für schöne Abende, aufmunternde Worte und tierärztliche Abwechslung vom Laboralltag.

Meinen Eltern, meiner Schwester Petra und Christian möchte ich für ihre unermüdliche Unterstützung, ihr Vertrauen, ihre Geduld, ihre Ideen und ihre Liebe danken. Sie geben mir einen Ort, an den ich immer wieder zurückkehren kann.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-5729-9



9 783835 195729